



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

KARAKTERIASI MOLEKULAR BAKTERI ASAM LAKTAT AMILOLITIK YANG BERPOTENSI SEBAGAI PROBIOTIK DARI FERMENTASI KAKAO DI SUMATERA BARAT

TESI S



RIRYN NOVIANTI
0921207023

PROGRAM STUDI KIMIA
PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2011

KARAKTERISASI MOLEKULAR BAKTERI ASAM LAKTAT AMILOLITIK YANG BERPOTENSI SEBAGAI PROBIOTIK DARI FERMENTASI KAKAO DI SUMATERA BARAT

Oleh: **RIRYN NOVIANTY**

(Di bawah bimbingan Prof.Dr. Sumaryati Syukur dan Prof.Dr. Abdi Dharma)

RINGKASAN

Kakao (*Theobroma cacao*) merupakan salah satu komoditi ekspor unggulan Indonesia yang memiliki kontribusi cukup besar dalam menghasilkan devisa Negara. Kakao berdasarkan populasinya dibagi menjadi tiga kelompok besar, yaitu *Criollo*, *Forastero* dan *Trinitario*. Pada dasarnya buah kakao terdiri atas 4 bagian yakni : kulit, *placenta*, *pulp*, dan biji. Fermentasi *pulp* kakao yang dapat memproduksi Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan salah satu kultur yang digunakan sebagai probiotik karena kebanyakan strainnya tidak patogen. Diantara genus BAL yang mempunyai potensi sebagai probiotik adalah *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium*. Pemberian probiotik dapat menguntungkan kesehatan karena menghasilkan asam-asam organik seperti asam laktat dan asam asetat yang menyebabkan suasana usus menjadi asam sehingga menurunkan pertumbuhan dan patogenitas bakteri serta memperbaiki keseimbangan mikroflora usus. Beberapa Bakteri Asam Laktat memiliki aktivitas amilase. Bakteri Asam Laktat Amilolitik dapat meningkatkan aktivitas amilase pada usus sehingga juga dapat meningkatkan pemanfaatan pati makanan dalam masa penyapihan hewan termasuk bayi manusia. Fakta bahwa Bakteri Asam Laktat Amilolitik dapat dikombinasikan dalam *single* fermentasi tidak hanya menyediakan cara untuk meningkatkan densitas energi dari bubur bayi tetapi juga meningkatkan keamanan dari BAL Amilolitik itu sendiri dari bahaya bakteri patogen. Formulasi dari Probiotik yang

mengandung enzim amilase sedang dikembangkan khususnya untuk membantu pencernaan makanan berupa karbohidrat.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi BAL yang memiliki aktivitas amilolitik dan berpotensi sebagai probiotik pada fermentasi kakao dari semua varietas yang ada serta mengidentifikasi gen 16S rRNA bakteri probiotik yang memiliki aktivitas amilolitik tertinggi dari semua varietas kakao baik itu *criollo* (Red), *forastero* (Green) maupun *Trinitario* (Hibrid).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat BAL yang diperoleh dari fermentasi pulp kakao semua varietas adalah sebanyak 20 isolat. Penampakan ke-20 koloni BAL pada media MRS Agar berbentuk bundar, berwarna putih susu dengan tepian licin dan elevasi cembung. Sementara uji gram, ke-20 isolat merupakan gram positif yang berbentuk batang dan coccus. Isolat yang memiliki zona bening tertinggi dalam mendegradasi substrat pati 1% adalah R2 (*Criollo*) dengan indeks zona bening 3,6. Kemudian Isolat R2 (*Criollo*) memiliki aktivitas enzim sebesar 1,480 U/mL dan aktivitas spesifik enzim sebesar 2,047 U/mg. Isolat R2 (*Criollo*) juga digunakan sebagai probiotik karena dapat melawan bakteri patogen dan juga resisten terhadap suasana asam. Analisis sekuen 16S rRNA dengan menggunakan kombinasi primer F-GAGTTTGATCCTGGCTCAG dan R-AAGGAGGTGATCCAGCC diperoleh panjang sekuen isolat R2 adalah 1457bp. Dari hasil analisis BLAST isolat terpilih, R2 mempunyai persentase kemiripan 99% dengan *Lactobacillus sp T23/3* yang tergolong Bakteri Asam Laktat. Dengan demikian, isolat R2 (*Criollo*) dapat digunakan sebagai pangan probiotik plus enzim amilase terutama untuk produk makanan pelengkap (sereal) bayi dan anak-anak.

Kata kunci: Fermentasi Kakao, Bakteri Asam Laktat, Enzim Amilase, Probiotik, Analisis gen 16S rRNA, primer, PCR, BLAST.

**KARAKTERISASI MOLEKULAR BAKTERI ASAM LAKTAT AMILOLITIK
YANG BERPOTENSI SEBAGAI PROBIOTIK DARI FERMENTASI KAKAO
DI SUMATERA BARAT**



**PROGRAM STUDI KIMIA
PASCASARJANA UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2011**



LAA HAULA WALAA QUWWATA

ILLAA BILLAAHIL 'ALIYYIL 'ADZHIIM

"TIDAK ADA DAYA SERTA KEKUATAN

SELAIN BERSAMA PERTOLONGAN ALLAH"

"Ilmu pengetahuan adalah karwan diwaktu sendirian, sahabat diwaktu sunyi,
petunjuk jalan kepada agama, pendorong katabahan disaat dalam
kekurangan dan kesusahan "

Alhamdulillahil aalamiin...

Karya kecil ini ku persembahkan untuk:

Ibuk & Bapak Tercinta; Atas kasih sayang dan pengorbanan yang tak terlingga...

Ayah Ghani; Terimakasih atas segala pengertian dan kesabaran

GHANI; Ksatria Kecilku yang menjadi sumberi inspirasi dan energi, Bunda sayang Ghani nak,...

Ku Bersyukur atas dukungan dari semua keluarga besar dan para sahabat

Special 4 "LactoTeam" we'll be @ legend

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan pada tanggal 9 November 1982 di Padang Panjang Sumatera Barat sebagai anak pertama dari tiga bersaudara dari pasangan Efri (Purn.) dan Yetri Wati.

Penulis menamatkan Sekolah Dasar pada tahun 1995 di SD 06 Maninjau. Penulis melanjutkan pendidikan ke SLTPN 1 Bukittinggi dan tamat tahun 1998. Kemudian penulis melanjutkan ke SMAN 2 Bukittinggi dan lulus pada tahun 2001. Setamat SMA Penulis melanjutkan pendidikan di Universitas Andalas jurusan Kimia dan memperoleh gelar sarjana pada bulan September tahun 2005.

Pada bulan Agustus tahun 2009, Penulis melanjutkan pendidikan S2 di Program Studi Kimia Pascasarjana Universitas Andalas Padang. Penulis kemudian menyelesaikan Studi pada Program Studi Kimia Pascasarjana Universitas Andalas Padang dan memperoleh gelar Magister tahun 2011.

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Dengan ini saya menyatakan bahwa isi tesis yang saya tulis dengan judul KARAKTERISASI MOLEKULAR BAKTERI ASAM LAKTAT AMILOLITIK YANG BERPOTENSI SEBAGAI PROBIOTIK DARI FERMENTASI KAKAO DI SUMATERA BARAT adalah hasil / karya saya bukan merupakan jiplakan dari hasil / karya orang lain, kecuali kutipan yang sumbernya dicantumkan. Jika kemudian hari pernyataan ini ternyata tidak benar, maka status kelulusan dan gelar yang saya peroleh menjadi batal dengan sendirinya.

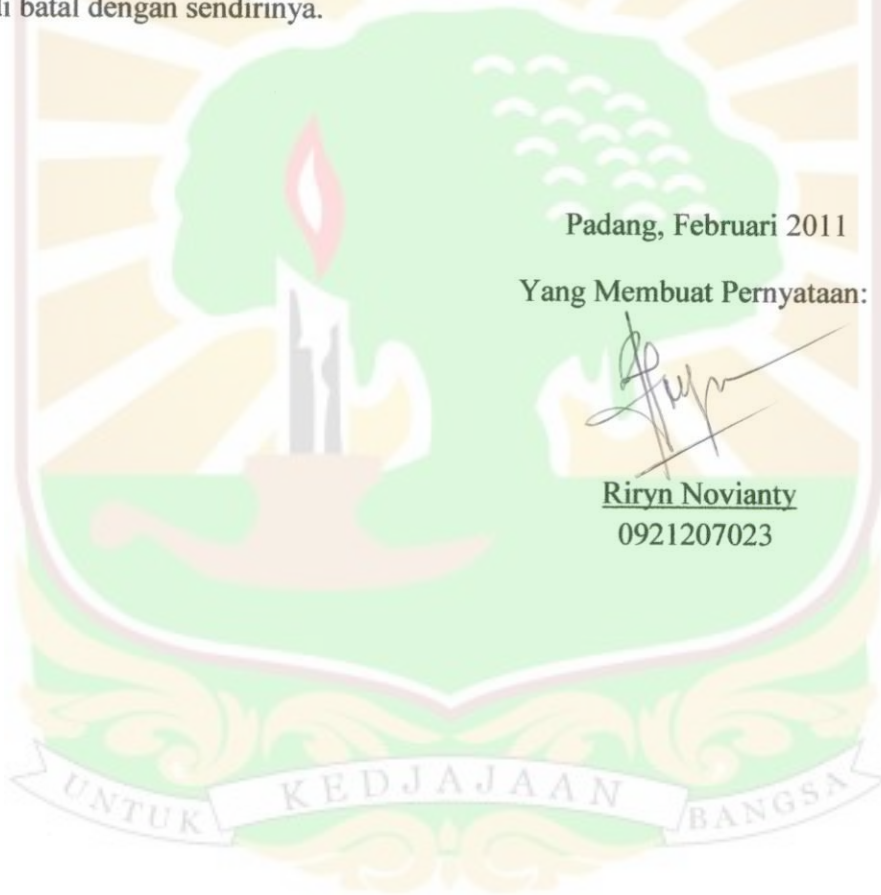
Padang, Februari 2011

Yang Membuat Pernyataan:



Riryn Novianty

0921207023



KATA PENGANTAR

Sesungguhnya segala puji hanyalah bagi Allah SWT karena telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis yang berjudul **“Karakterisasi Molekular Bakteri Asam Laktat Amilolitik Yang Berpotensi Sebagai Probiotik Dari Fermentasi Kakao di Sumatera Barat”**.

Penulis sangat berterimakasih kepada Ibu Prof. Dr. Sumaryati Syukur, M.Sc. PhD dan Bapak Prof. Dr. Abdi Darma, M.Sc. PhD yang telah bersedia meluangkan waktu, tenaga dan fikiran dalam memberikan bimbingan dan arahan kepada penulis selama penyelesaian tesis ini. Penulisan tesis ini juga tidak lepas dari dorongan, semangat dan do'a yang diberikan oleh semua pihak yang telah membantu penyelesaian tesis ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan tesis ini masih banyak memiliki kekurangan yang tidak penulis sadari, maka dari itu penulis mengharapkan kritik dan saran dari pembaca yang bersifat membangun demi kesempurnaan tesis ini. Semoga Allah SWT memberikan balasan yang setimpal atas bantuan dan dukungan yang diberikan. Amiin...

Padang, Februari 2011

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	i
DAFTAR ISI.....	ii
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR LAMPIRAN.....	vii
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	6
1.3. Tujuan Penelitian	6
1.4. Hipotesa.....	6
1.5. Manfaat Penelitian	6
II. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Kakao	7
2.2. Fermentasi Asam Laktat	8
2.3. Bakteri asam Laktat.....	9
2.4. Probiotik	13
2.5. Enzim	16
2.6. Enzim Amilase	20
2.7. Amplifikasi 16S rRNA.....	22
2.8. <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	24
III. METODOLOGI PENELITIAN.....	27
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	27

3.2. Alat dan Bahan	27
3.3. Persiapan Penelitian	28
3.3.1. Fermentasi Kakao	28
3.3.2. Sterilisasi alat yang digunakan	28
3.3.3. Persiapan dan pembuatan media	28
3.3.4. Pembuatan Reagen	29
3.3.5. Isolasi dan Identifikasi BAL dari fermentasi Kakao	30
3.3.5.1. Proses Enrichment	30
3.3.5.2. Proses Cereal Dilution	30
3.3.5.3. Proses Plating	30
3.3.6. Identifikasi Morfologi Bakteri Asam Laktat	31
3.3.6.1. Identifikasi Makroskopis	31
3.3.6.2. Identifikasi Mikroskopis	31
3.3.7. Uji Enzim Amilase	31
3.3.7.1. Uji Kualitatif	31
3.3.7.2. Uji Kuantitatif	32
3.3.8. Uji Potensi Probiotik	34
3.3.8.1. Uji Antimikroba	34
3.3.8.2. Uji Resistensi Probiotik terhadap Asam	34
3.3.9. Isolasi DNA Bakteri Asam Laktat	35
3.3.10. Amplifikasi Gen Pengkode 16S rRNA	35
3.3.11. Gel Elektroforesis	36
3.3.12. Sekuensing Nukleotida	36

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	37
4.1. Fermentasi Kakao.....	37
4.2. Isolasi Bakteri Asam Laktat.....	39
4.3. Identifikasi Morfologi BAL.....	42
4.3.1. Identifikasi makroskopis.....	42
4.3.2. Identifikasi Mikroskopis.....	43
4.4. Uji Enzim Amilase.....	45
4.4.1. Uji Kualitatif.....	45
4.4.2. Uji Kuantitatif.....	46
4.5. Uji Potensi Probiotik.....	51
4.5.1. Uji Anti Mikroba.....	51
4.5.2. Uji Resistensi Terhadap Asam.....	56
4.6. Isolasi DNA Genomik.....	62
4.7. Amplifikasi Gen Pengkode 16S rRNA dengan PCR.....	63
4.8. Analisis Sekuen Gen 16S rRNA Isolat R2.....	64
4.9. Analisis BLAST Sekuen DNA R2.....	66
V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	69
5.1. Kesimpulan.....	69
5.2. Saran.....	69
DAFTAR PUSTAKA.....	70
LAMPIRAN.....	74

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Karakteristik 3 sub genus <i>Lactobacillus sp</i>	12
2. Perbandingan kromosom rRNA	23
3. Hasil Isolasi Bakteri Asam Laktat	41
4. Hasil Uji Gram dan morfologi isolat BAL.....	44
5. Nilai Absorbansi standar Maltosa	47
6. Nilai Absorbansi standar BSA.....	48
7. Hasil pengamatan kultur BAL.....	57



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Buah <i>Theobroma Cacao</i>	8
2. Morfologi sel BAL	10
3. Produk probiotik.....	15
4. Kurva Energi Aktivasi.....	16
5. Tempat pemutusan enzim pada molekul amilosa.....	22
6. Mekanisme PCR.....	26
7. Penampakan BAL pada medium MRS Agar.....	42
8. Pewarnaan Gram	43
9. Skrining zona bening terluas.....	45
10. Kurva standar Maltosa.....	47
11. Kurva standar protein BSA	49
12. Grafik hasil pengamatan zona bening terhadap <i>E.coli</i>	51
13. Grafik hasil pengamatan zona bening terhadap <i>Streptococcus</i>	53
14. Grafik hasil pengamatan zona bening terhadap <i>Staphylococcus</i>	54
15. Grafik hasil pengamatan zona bening terhadap <i>Pseudomonas</i>	55
16. Grafik hasil pengamatan zona hambat pH 2-6 pada <i>E.coli</i>	58
17. Grafik hasil pengamatan zona hambat pH 2-6 pada <i>Streptococcus</i>	59
18. Grafik hasil pengamatan zona hambat pH 2-6 pada <i>Staphylococcus</i>	60
19. Grafik hasil pengamatan zona hambat pH 2-6 pada <i>Pseudomonas</i>	61
20. Gambar amplifikasi gen 16S rRNA	63
21. Hasil electrophoregram primer forward.....	64
22. Hasil electrophoregram primer reverse	65
23. Hasil analisa BLAST	66
24. Pohon Filogenetik.....	67

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema kerja	74
2. Fermentasi kakao	75
3. Isolasi Bakteri Asam Laktat dari fermentasi kakao	76
4. Uji aktivitas antimikroba	77
5. Uji resistensi Bakteri Probiotik terhadap asam	78
6. Uji kualitatif amilase	79
7. Uji kuantitatif amilase	80
8. Isolasi DNA	81
9. Amplifikasi gen 16s rRNA dengan PCR.....	82
10. Gambar 20 isolat BAL.....	83
11. Identifikasi makroskopis isolat BAL.....	86
12. Hasil uji kualitatif enzim amilase	88
13. Data pembuatan standar BSA pada panjang gelombang 685 nm.....	89
14. Data pembuatan kurva kalibrasi standar maltosa pada panjang gelombang 550 nm.....	90
15. Uji antimikroba.....	91
16. Uji resistensi terhadap asam	92
17. Urutan sekuensing nukleotida	94

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kakao (*Theobroma cacao*) merupakan salah satu komoditi ekspor unggulan Indonesia yang memiliki kontribusi yang cukup besar dalam menghasilkan devisa negara. Tanaman perkebunan ini telah mendorong dunia agribisnis Indonesia menjadi lebih menggeliat. Tanaman kakao bukanlah tanaman asli yang berasal dari Indonesia namun berasal dari benua Amerika yang mempunyai iklim tropis. Kakao berpotensi menjadi produk unggulan perkebunan di Indonesia karena iklim Indonesia yang tropis dan dapat memenuhi syarat tumbuh tanaman tersebut selayaknya dibudidayakan di tempat asalnya. Saat ini Indonesia merupakan produsen kakao nomor tiga terbesar di dunia setelah Pantai Gading dan Ghana. Perkebunan kakao di Indonesia sebagian besar terletak di Pulau Sulawesi. Luas perkebunan ini sekitar 953.691 Ha atau 60 persen dari seluruh perkebunan kakao di Indonesia. Salah satu sentra produksi kakao di Indonesia adalah Propinsi Sumatera Barat dimana pada tahun 2005 Sumbar berada pada urutan ke sepuluh penghasil kakao dengan luas perkebunan 21.139 Ha. Sentra pengembangan kakao di Provinsi Sumatera Barat adalah di Kabupaten Padang Pariaman, Pasaman, Agam, Limapuluh Kota, Pesisir Selatan, Solok, Tanah Datar, Padang dan Kabupaten lainnya. Kota Padang sebagai Ibukota Provinsi Sumatera Barat memiliki Lokasi Prima Tani Kakao dengan luas diperkirakan mencapai 25 hektar pada ketinggian 30-105 m di atas permukaan laut dengan topografi datar sampai berbukit di Kelurahan Lubuk Minturun Sungai Lareh Kecamatan Koto Tangah (BPTP, 2008).

Kakao berdasarkan populasinya dibagi menjadi tiga kelompok besar, yaitu *Criollo*, *Forastero* dan *Trinitario*. *Criollo* merupakan tipe kakao pilihan (mulia) dan buahnya berwarna merah. Bijinya cenderung berbentuk bulat dan berwarna putih di bagian dalam serta menghasilkan kakao dengan rasa yang lembut dan istimewa, akan tetapi mudah terkena penyakit. *Forastero* merupakan tipe yang bermutu rendah (kakao lindak), buahnya berwarna hijau dan relatif tahan terhadap beberapa jenis hama dan penyakit. *Trinitario* merupakan campuran atau hibrida dari jenis *Criollo* dan *Forastero*. Jenis *Trinitario* menghasilkan biji yang termasuk fine flavour cocoa (kakao mulia) dan ada yang termasuk bulk cocoa (kakao lindak) (Spillane, 1995). Varietas kakao hibrida berkualitas unggul karena daya tumbuh (vigor) yang lebih tinggi, relatif lebih tahan penyakit, dan potensi hasilnya lebih tinggi (Winarno, 1986).

Pada dasarnya buah kakao terdiri atas 4 bagian yakni : kulit, *placenta*, *pulp*, dan biji. Buah kakao masak berisi 30-40 biji yang diselubungi oleh *pulp* dan *placenta*. *Pulp* merupakan jaringan halus yang berlendir yang membungkus biji kakao, keadaan zat yang menyusun *pulp* terdiri dari 80-90% air dan 8-14% gula sangat baik untuk pertumbuhan mikroorganisme yang berperan dalam proses fermentasi (Bintoro, 1977).

Fermentasi pada biji kakao terjadi dalam dua tahap yaitu fermentasi anaerob dan fermentasi aerob. Pada hari pertama proses fermentasi, keberadaan asam sitrat membuat lingkungan *pulp* menjadi asam sehingga akan menginisiasi pertumbuhan ragi dan terjadi fermentasi secara anaerob. Ragi memegang peranan pada proses pemecahan gula menjadi alkohol. Aktivitas ragi sangat kuat dan lebih dari 90 % total mikroorganisme yang terdapat pada tahap ini adalah ragi. Jenis

ragi yang umum terdapat pada tumpukan biji kakao selama fermentasi adalah *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces theobromae*, *Saccharomyces ellipsoides*, *Saccharomyces apiculatus* dan *Saccharomyces apimulus* (Nasution, 1980). Ragi akan mati oleh alkohol yang dihasilkan dan juga oleh suhu yang makin tinggi. Selanjutnya Fermentasi aerob akan diinisiasi oleh bakteri asam asetat pada waktu fermentasi 12 jam. Bakteri Asam Laktat akan tumbuh optimal pada waktu 36-48 jam. Pada hari ke tiga spesies yang akan tumbuh adalah *Bacillus* dan populasinya akan tetap tinggi selama proses fermentasi dianggap selesai (Ardana, 2003).

Fermentasi *pulp* kakao yang dapat memproduksi Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan salah satu kultur yang digunakan sebagai probiotik karena kebanyakan strainnya tidak patogen. Diantara genus BAL yang mempunyai potensi sebagai probiotik adalah *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* (Salminen et. al 2004). Pemberian probiotik dapat menguntungkan kesehatan karena menghasilkan asam-asam organik seperti asam laktat dan asam asetat yang menyebabkan suasana usus menjadi asam sehingga menurunkan pertumbuhan dan patogenitas bakteri serta memperbaiki keseimbangan mikroflora usus. Beberapa genus bakteri ini juga menghasilkan senyawa inhibitor lain seperti hidrogen peroksida (H_2O_2) dan bakteriosin yang memberikan efek antagonis terhadap pertumbuhan bakteri patogen (Syukur, 2006).

Beberapa *Lactobacillus* yang tergolong probiotik adalah *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus rhamnosus* dan sebagainya. Mengkonsumsi BAL dari fermentasi makanan secara berkala dapat memperoleh

efek berkaitan dengan anti kanker, anti mutagenik dan anti aktivitas tumorigenik (Ray dan Panda, 2007). Selanjutnya Probiotik *Lactobacillus* cukup signifikan dalam industri berbasis fermentasi untuk memproduksi berbagai macam fermentasi makanan diantaranya fermentasi sayuran seperti kol dan timun, dadih dan yoghurt, acar- lacto, kefir dan fermentasi susu (Steinkraus, 2002) untuk memproduksi Asam Laktat sebagai food aditif (Vishnu et al., 2007). Beberapa spesies *lactobacilli* seperti *L. acidophilus* dan *L. plantarum* umumnya digunakan sebagai “kultur-starter” di dalam fermentasi sayur dan buah-buahan (Panda et al., 2007).

Beberapa produk probiotik plus enzim yang dipasarkan diantaranya dengan merk “polyenzyme plus”, Probiotic Bioplus 2b, C”. F-biotic dan sebagainya (Naidu et al., 1999). Formulasi Probiotik yang mengandung enzim seperti amilase, pektinase dan protease, *lactobacilli*, vitamin dan mineral sedang dikembangkan untuk mencegah terbentuknya gas yang berlebih di dalam sistem pencernaan, baik di lambung maupun usus halus dan usus besar, konstipasi dan malabsorpsi terhadap gizi dan untuk memberikan dukungan pada saluran pencernaan dengan menciptakan lingkungan yang kondusif untuk kolonisasi organisme probiotik (Collington et al., 1990).

Beberapa Bakteri Asam Laktat memiliki aktivitas amilase (Vishnu et al., 2006). *Lactobacillus* amilase menunjukkan peranan penting dalam saluran pencernaan dari ayam dan mamalia seperti babi, kelinci, kuda dan manusia termasuk bayi (Nowroozi et al., 2004). *Lactobacillus* amilase dapat mendegradasi amilosa yang ada dalam makanan menjadi monosakarida dan difermentasi menjadi asam laktat sehingga dapat lebih mudah berasimilasi dalam tubuh dan

juga dapat meningkatkan pemanfaatan amilosa makanan dan meningkatkan pencernaan. Asam laktat diproduksi di dalam sistem pencernaan pada lingkungan pH yang rendah, sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Salmonella*, *Staphylococcus* dan *Escherichia Coli* (Rincker et al., 2000). Bakteri Asam Laktat Amilolitik saat ini digunakan dalam mempersiapkan sereal dengan High Energy Density (HED) untuk meningkatkan pemanfaatan amilum pada makanan bayi dan anak-anak (Nguyen et al., 2007).

Bakteri Asam Laktat Amilolitik dapat meningkatkan aktivitas amilase pada usus sehingga juga dapat meningkatkan pemanfaatan amilosa makanan dalam masa penyapihan hewan termasuk bayi manusia (Nguyen et al., 2007). Fakta bahwa Bakteri Asam Laktat Amilolitik dapat dikombinasikan dalam single fermentasi tidak hanya menyediakan cara untuk meningkatkan densitas energi dari bubur bayi tetapi juga meningkatkan keamanan dari BAL Amilolitik itu sendiri. Dengan memberikan Bakteri Asam Laktat Amilolitik merupakan cara efisien untuk menghambat makanan yang membawa patogen (Guyot et al., 2005). Formulasi dari Probiotik yang mengandung enzim amilase sedang dikembangkan khususnya untuk membantu pencernaan makanan berupa karbohidrat.

Berdasarkan hal diatas peneliti tertarik untuk melakukan penelitian tentang isolasi dan karakterisasi molekular bakteri asam laktat yang menghasilkan enzim amilase dan juga berpotensi sebagai probiotik pada fermentasi kakao. Penelitian ini meliputi identifikasi morfologi bakteri asam laktat, uji enzim amilase, uji probiotik kemudian melakukan karakterisasi molekular bakteri probiotik penghasil amilase tinggi dari semua varietas kakao.

1.2. Perumusan Masalah

Masih belum adanya penelitian tentang karakterisasi BAL yang memiliki aktivitas amilolitik dan berpotensi sebagai probiotik dari fermentasi kakao. Sedangkan di Indonesia terutama daerah Sumbar banyak terdapat perkebunan kakao yang memiliki potensi besar sebagai sumber probiotik plus enzim yang sangat bermanfaat bagi dunia kesehatan.

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi BAL yang memiliki aktivitas amilolitik dan berpotensi sebagai probiotik pada fermentasi kakao dari semua varietas yang ada serta mengidentifikasi gen 16S rRNA bakteri probiotik yang memiliki aktivitas amilolitik tertinggi dari semua varietas kakao baik itu *criollo* (Red), *forastero* (Green) maupun *Trinitario* (Hibrid).

1.4 Hipotesis

Diduga adanya Bakteri Asam Laktat (BAL) yang memiliki aktivitas amilolitik dan juga berfungsi sebagai agen probiotik pada fermentasi pulp kakao.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Sebagai sumber informasi spesies BAL yang bersifat probiotik dan memiliki aktivitas amilolitik tertinggi dari fermentasi kakao semua varietas sehingga menambah koleksi pada database penelitian BAL yang dapat dimanfaatkan sebagai pangan probiotik plus enzim.
2. Sebagai sumber informasi karakteristik BAL amilolitik yang berfungsi sebagai probiotik sehingga dapat digunakan untuk produk makanan terutama untuk mempersiapkan densitas energi yang tinggi pada makanan pelengkap anak-anak.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Theobroma cacao*

Kakao adalah tumbuhan asli Brasil. Di Indonesia kakao pertama kali diperkenalkan di Minahasa (Sulawesi) pada tahun 1560 oleh orang Spanyol. Tanaman kakao (*Theobroma cacao*) adalah tanaman daerah tropis yang merupakan tanaman tahunan karena berbunga dan berbuah sepanjang tahun. (Ardyansya, 2009)

Jenis kakao yang dibudidayakan adalah :

1. *Criollo*, merupakan tanaman kakao yang pertumbuhannya kuat, daya hasil rendah, relatif gampang terserang hama dan penyakit. Permukaan kulit buah kasar, berbenjol-benjol dan alur-alurnya jelas. Kulit buah tebal tapi lunak, sehingga mudah dipecah. Kadar lemak biji rendah, ukuran biji besar, bentuknya bulat dan mempunyai cita rasa khas yang baik sehingga dikenal sebagai kakao mulia, fine flavour cocoa, chiced cocoa atau edel cocoa.
2. *Forastero*, merupakan tanaman kakao yang pertumbuhannya kuat dan cepat, daya hasil tinggi, relatif tahan terhadap hama dan penyakit. Permukaan kulit buah relatif halus karena alur-alurnya dangkal. Kulit buah tipis tetapi keras (liat), kadar lemak tinggi, bentuk biji lonjong (oval), pipih dan keping biji berwarna ungu gelap. *Forestero* menghasilkan kakao bermutu sedang dan dikenal sebagai ordinary cocoa, bulk cocoa atau kakao lindak.
3. *Trinitario*, merupakan tanaman kakao hibrid alami dari *Criollo* dan *Forestero*, sehingga menghasilkan biji kakao yang dapat termasuk fine flavour cocoa atau bulk cocoa (Lukito A.M 2004).



Gambar 1. Buah *Theobroma Cacao* (1) Jenis *Criollo*, (2) Jenis *Forestero*, (3) Jenis *Trinitario*

2.2. Fermentasi Asam Laktat

Fermentasi adalah proses produksi energi dalam sel terjadi secara anaerob dengan atau tanpa akseptor eksternal. Gula seperti glukosa, fruktosa dan sukrosa sebagai bahan dasar ketika difermentasi dalam kondisi anaerob akan menghasilkan etanol, asam laktat, asam butirat, aseton dan hidrogen. Reaksi fermentasi sederhana sebagai berikut:



Fermentasi merupakan kegiatan mikroba pada bahan pangan untuk menghasilkan produk yang diinginkan. Mikroba yang umum ditemukan dalam fermentasi adalah bakteri, khamir dan kapang. Fermentasi dapat dilakukan menggunakan kultur murni, kultur alami, kultur tunggal dan kultur campuran. Fermentasi dengan menggunakan kultur alami umumnya dilakukan pada fermentasi tradisional yang memanfaatkan mikroorganisme yang ada di lingkungan. Kultur murni adalah mikroorganisme yang akan digunakan dalam fermentasi dengan sifat dan karakteristik yang telah diketahui dengan pasti sehingga produk yang dihasilkan memiliki stabilitas dan kualitas yang jelas. Dalam proses fermentasi kultur murni dapat digunakan secara tunggal ataupun

secara campuran. Contoh penggunaan kultur murni tunggal adalah *Lactobacillus casei* pada fermentasi susu sedangkan contoh campuran kultur murni adalah fermentasi kecap yang menggunakan *Aspergillus oryzae*, *Pediococcus sp* dan *Saccharomyces rouxii* (Stanbury, 1984).

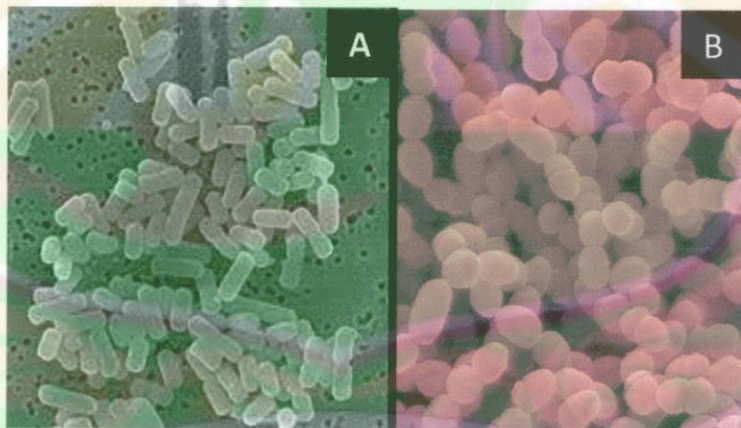
2.3. Bakteri Asam Laktat (BAL)

Bakteri asam laktat (BAL) secara luas digunakan sebagai starter untuk fermentasi makanan, minuman, daging dan sayuran. Bakteri asam laktat adalah kelompok bakteri yang mampu mengubah karbohidrat (glukosa) menjadi asam laktat. BAL termasuk mikroorganisme yang aman jika ditambahkan dalam pangan karena sifatnya yang tidak toksik dan tidak menghasilkan toksin, maka disebut sebagai *food grade microorganism* atau dikenal sebagai mikroorganisme yang *Generally Recognized As Safe (GRAS)* yaitu mikroorganisme yang tidak beresiko terhadap kesehatan.

BAL mempunyai aktivitas yang berlawanan dengan beberapa mikroorganisme tertentu. Selama proses fermentasi BAL memproduksi asam organik, metabolit primer dan menurunkan pH lingkungannya menjadi 3 sampai 4,5 sehingga dapat membunuh bakteri lain yang hidup pada kisaran pH 6-8. Di samping itu BAL mengekresikan senyawa yang mampu menghambat mikroorganisme patogen seperti hidrogen peroksida (H_2O_2), diasetil, CO_2 , asetaldehid, d-isomer asam-asam amino, dan bakteriosin. Bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat mudah diterima sebagai bahan tambahan dalam makanan baik oleh ahli kesehatan maupun oleh konsumen karena bakteri ini secara alami berperan dalam proses fermentasi makanan. Genus bakteri yang tergolong kepada BAL adalah *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*,

Lactococcus, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* (Nettles & Barefoot, 1993).

BAL dari genus *Lactobacillus* merupakan bakteri gram positif, anaerobik fakultatif atau mikroaerofilik. berbentuk batang (0,5-1,5 s/d 1,0-10 μm) dan tidak bergerak (non motil). Genus *Lactococcus* mempunyai ciri-ciri morfologi sebagai berikut: warna koloni putih susu atau agak krem, bentuk koloni bundar atau bulat besar, sel berbentuk bola yang berukuran 0,5-1,2 x 0,5-1,5 μm . Genus *Enterococcus*, merupakan bakteri asam laktat gram positif, sel berbentuk coccus (bulat), mesofilik dan homofermentatif, Kemampuan untuk menghasilkan katalase dan oksidase adalah negatif, Suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri genus ini adalah 10-45^oC dan tumbuh baik pada 6,5 % NaCl. Berikut adalah gambar morfologi sel BAL yang berbentuk basil dan coccus.



Gambar 2. Morfologi sel BAL berbentuk basil dan coccus (A). *Lactobacillus* (B). *Streptococcus*

Secara alami beberapa habitat yang cocok untuk pertumbuhan BAL adalah produk-produk susu baik yang segar maupun yang difermentasi, bagian tanaman baik yang segar maupun yang telah membusuk, saluran pencernaan hewan dan manusia.

Secara fisiologis dan berdasarkan aktivitas metabolismenya, bakteri asam laktat dikelompokkan kedalam dua group, yaitu homofermentatif dan heterofermentatif.

1. Bakteri asam laktat homofermentatif, melibatkan jalur Embden Meyerhof yaitu glikolisis menghasilkan asam laktat, 2 mol ATP dari 1 molekul glukosa/heksosa dalam kondisi normal, tidak menghasilkan CO_2 dan menghasilkan biomassa sel dua kali lebih banyak dari pada bakteri asam laktat heterofermentatif.
2. Bakteri asam laktat heterofermentatif, penguraian glukosa oleh BAL melalui jalur pentose fosfat. Pada fermentasi ini yang bekerja adalah enzim fosfoketolase dan dapat menghasilkan asam laktat 40-50 %, etanol, asam asetat dan CO_2 (Surono, 2004).

Kondisi pertumbuhan yang berbeda bisa menghasilkan produk akhir fermentasi yang berbeda, sebagai akibat dari berubahnya metabolisme piruvat dan penggunaan elektron akseptor eksternal seperti oksigen atau senyawa organik. Genus *Lactobacillus* terdiri dari 70 spesies dan dikelompokkan menjadi 3 sub grup (Tabel 1), kebanyakan homofermentatif, namun ada juga yang heterofermentatif. *Lactobacillus* secara umum lebih tahan terhadap asam dibandingkan dengan genus bakteri asam laktat lainnya (Sharpe, 1981; Kandler, 1986).

Tabel 1. Karakteristik 3 sub grup genus *Lactobacillus* sp.

Karakteristik	Spesies
Homofermentatif	
Produk utama asam laktat (> 85% dari glukosa)	<i>L. Acidophilus</i>
tidak menghasilkan gas dari glukosa, mempunyai enzim aldolase, tidak mempunyai fosfoketolase	<i>L. Salivarius</i>
1. Tumbuh pada 45°C, tetapi tidak pada 15°C, sel berbentuk batang panjang.	<i>L. Helveticus</i>
	<i>L. Delbrueckii</i>
2. Tumbuh pada 15°C, beberapa tumbuh pada 45°C, batang pendek, mempunyai aldolase dan fosfoketolase, fakultatif heterofermentatif.	<i>L. Plantarum</i>
Heterofermentatif :	
Menghasilkan kira-kira 50% asam laktat dari glukosa; menghasilkan CO ₂ dan etanol, tidak mempunyai enzim aldolase, mempunyai fosfoketolase; berbentuk batang panjang dan pendek	<i>L. Fermentum</i>
	<i>L. Reuteri</i>
	<i>L. Brevis</i>
	<i>L. Buchneri</i>
	<i>L. Reuteri</i>

Sumber : Sharpe, 1981; Kandler & Weiss 1986

Pada tabel diatas memperlihatkan bahwa fermentasi homolaktat pada *Lactobacillus* menghasilkan ekuimolar konsentrasi asam laktat dari glukosa, sedangkan heterolaktat menghasilkan lebih dari 50% asam laktat dan juga etanol dan CO₂ sehingga mudah untuk membedakan antara homofermentatif dan heterofermentatif berdasarkan pembentukan gas selama pertumbuhan genus

Lactobacillus sp. Dalam media yang mengandung glukosa. (Nicklin, Graeme-Cook, Paget and Killington, 1999) Demikian juga dengan mengukur nilai keasaman (pH) kultur medium yang tentunya lebih rendah bagi homofermentatif dibandingkan dengan heterofermentatif. Tabel diatas memperlihatkan bahwa suhu pertumbuhan juga bisa digunakan untuk membedakan spesies *Lactobacillus* secara taksonomi (Woelford, 1984).

2.4. Probiotik

Bakteri secara sederhana dapat dikelompokkan menjadi bakteri " baik " dan bakteri " jahat " atau patogen. Bakteri patogen inilah yang menyebabkan banyak penyakit seperti diare, tifus, tetanus, TBC, bahkan antraks. Apabila di lingkungan tersebut bakteri patogen lebih dominan, maka terjadilah penyakit (Purwati, 1998).

Probiotik adalah bakteri hidup yang diberikan sebagai suplementasi makanan. Pemberian probiotik dapat berpengaruh menguntungkan bagi kesehatan dimana probiotik menghasilkan asam laktat dan asetat yang menyebabkan suasana usus menjadi asam serta H_2O_2 dan bakteriosin yang memberikan efek antagonis terhadap pertumbuhan bakteri patogen sehingga menurunkan pertumbuhan dan patogenitas bakteri tersebut serta memperbaiki keseimbangan mikroflora usus. Mikroflora yang digolongkan sebagai probiotik terutama dari golongan *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* (Syukur, 2006).

Tidak semua bakteri baik dapat dimanfaatkan sebagai agen probiotik. Jenis yang dipilih harus mempunyai minimal satu dari karakteristik berikut:

1. Memiliki aktivitas antimikroba. Dalam hal ini probiotik dapat berperan sebagai antibiotik alami. Beberapa jenis bakteri asam laktat mampu memproduksi asam-asam organik, hidrogen peroksida dan bakteriosin. Senyawa-senyawa ini terutama bakteriosin dapat menyebabkan kematian pada bakteri lain.
2. Resisten terhadap seleksi sistem saluran pencernaan seperti asam lambung, cairan empedu, dan getah pankreas. Apabila bakteri tidak memiliki karakteristik ini, maka bakteri tersebut akan mati sebelum mencapai usus.
3. Memiliki aktivitas antikarsinogenik. Adanya senyawa karsinogenik seperti nitrosamin yang masuk ke saluran pencernaan, akan dapat dicegah penyerapannya oleh bakteri tersebut dengan membentuk selaput protein dan vitamin.
4. Mampu berkoloni dalam saluran pencernaan. Bakteri probiotik harus memiliki kemampuan untuk bersimbiosis dengan flora usus, sehingga dapat melakukan proses yang diinginkan dan tidak cepat terbuang bersama tinja.
5. Mampu meningkatkan kemampuan penyerapan usus. Beberapa penyakit seperti diare pada anak-anak dapat terjadi karena kurangnya enzim laktase dalam tubuh, sehingga saluran pencernaan tidak dapat mencerna susu. Bakteri asam laktat dapat menguraikan laktosa dalam susu yang dikonsumsi menjadi monosakarida glukosa dan galaktosa yang mudah dicerna (Syukur, 2006).

Bakteri yang paling banyak digunakan sebagai agen probiotik adalah golongan *Lactobacillus*. Jenis ini memiliki hampir semua karakteristik yang diperlukan. *Lactobacillus* juga dapat menurunkan pH lingkungan dengan mengubah gula menjadi asam laktat. Kondisi ini akan menghambat pertumbuhan

beberapa jenis bakteri patogen. Keistimewaan inilah yang membuat bakteri *Lactobacillus* menjadi agen untuk bermacam produk probiotik di seluruh dunia. Beberapa contoh yang telah dipasarkan adalah *Lactobacillus casei* strain Shirota, diproduksi perusahaan dari Jepang. Bakteri ini mampu mengkolonisasi usus, *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 yang merupakan hasil penelitian VTT di Finlandia yang memiliki kemampuan antimikroba terhadap *Candida* dan patogen lain dalam saluran pencernaan. *Lactobacillus reuteri* dihasilkan perusahaan Biogaia, Swedia. Jenis bakteri ini efektif melawan penyebab diare pada anak-anak dengan menghasilkan antibakteri reuterin (Syukur, 2006).

Beberapa produk fermentasi yang mengandung bakteri asam laktat adalah :

- Kefir
- Yogurt
- Sauerkraut
- Kimchi
- Kombucha

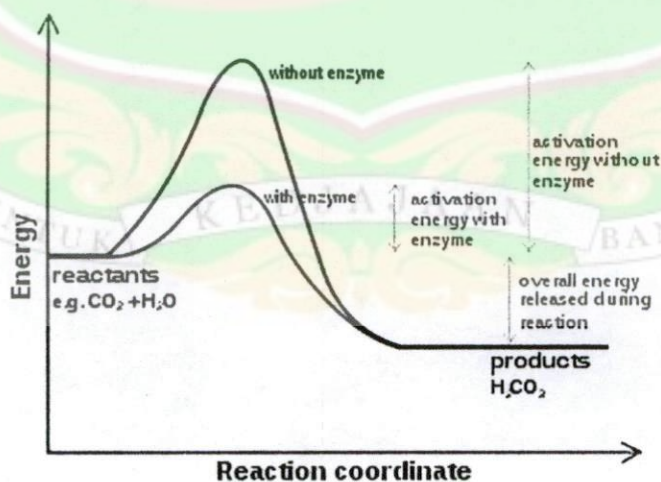


Gambar 3. Produk Probiotik

2.5. Enzim

Enzim adalah suatu gugus polipeptida (protein) yang berfungsi sebagai katalis (senyawa yang mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi) dalam suatu reaksi kimia atau mengaktifkan senyawa lain secara spesifik (Maier *et al.*, 2000). Hampir seluruh enzim adalah protein yang hanya disintesis oleh dan di dalam sel. Enzim akan di sintesis jika sel mempunyai gen yang mengkode enzim tersebut.

Enzim memiliki sifat-sifat tertentu di antaranya enzim merupakan senyawa yang jauh lebih kecil sehingga reaksi dapat berlangsung di dalam sel, dalam mengkatalis enzim bereaksi terlebih dahulu dengan substrat hingga membentuk kompleks enzim substrat sebelum menghasilkan produk, enzim dapat meningkatkan laju reaksi sekitar $10^7 - 10^{13}$ kali lebih cepat dari katalis non enzim, enzim menurunkan energi aktivasi suatu reaksi, dan enzim bekerja pada substrat spesifik (Poedjiadi, 2007). Enzim dalam berfungsi sebagai katalis dengan cara menurunkan energi aktivitas reaksi seperti terlihat pada Gambar .



Gambar 4. Kurva energi aktivasi reaksi kimia dengan atau tanpa enzim

Enzim dibentuk dalam protoplasma sel, berdasarkan aktivitasnya dikelompokkan menjadi:

1. Enzim intraseluler atau Endoenzim

Merupakan enzim yang langsung digunakan di dalam sel, dan sering ditemukan pada bagian membran dari sebuah organel sel enzim intraseluler dapat diekstrak dari dalam sel lewat proses pemecahan sel (Maier *et al.*, 2000).

2. Ekstraseluler atau Eksoenzim

Merupakan enzim yang dilepas dari sel ke lingkungan untuk menghidrolisis molekul polimer di lingkungan, seperti selulosa, hemiselulosa, lignin, ataupun juga untuk memfasilitasi pengambilan suatu zat dari lingkungan bagi kebutuhan metabolismenya (Maier *et al.*, 2000). Enzim ekstraseluler dapat dipisahkan dari lingkungan dengan filtrasi ataupun sentrifugasi (Palmer, 1985).

Faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim

a. Pengaruh Konsentrasi Enzim

Kecepatan suatu reaksi yang menggunakan enzim tergantung pada konsentrasi enzim tersebut. Pada suatu konsentrasi substrat tertentu, kecepatan reaksi bertambah dengan bertambahnya konsentrasi enzim.

b. Pengaruh Konsentrasi Substrat

Konsentrasi enzim yang tetap, maka penambahan konsentrasi substrat akan menaikkan kecepatan reaksi. Tetapi pada batas konsentrasi tertentu tidak akan terjadi kenaikan kecepatan reaksi walaupun konsentrasi substrat diperbesar. Pada konsentrasi substrat rendah, sisi aktif enzim hanya menampung sedikit substrat. Bila konsentrasi substrat diperbesar, makin banyak substrat yang dapat berhubungan dengan sisi aktif enzim. Maka konsentrasi kompleks enzim substrat

semakin besar dan akan menyebabkan semakin besarnya kecepatan reaksi. Pada suatu batas konsentrasi substrat tertentu semua sisi aktif dipenuhi oleh substrat atau telah jenuh dengan substrat. Pada keadaan ini, bertambah besarnya konsentrasi substrat tidak menyebabkan bertambahnya konsentrasi kompleks enzim substrat sehingga tidak menambah jumlah hasil reaksi.

c. Pengaruh Suhu

Suhu berpengaruh besar terhadap aktivitas enzim. Semua enzim bekerja dalam rentang suhu tertentu pada tiap jenis organisme. Peningkatan suhu eksternal secara umum akan meningkatkan kecepatan reaksi kimia enzim, tetapi kenaikan suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan terjadinya denaturasi enzim yaitu kerusakan struktur protein enzim, terutama kerusakan pada ikatan ion dan ikatan hidrogennya. Hal ini menyebabkan terjadinya penurunan kecepatan reaksi yang dikatalis oleh enzim tersebut. Denaturasi enzim di atas suhu optimum akan menyebabkan terjadinya kematian pada sel organisme, tetapi beberapa organisme mampu bertahan hidup dan tetap aktif pada suhu yang sangat tinggi, di mana organisme lain sudah tidak mampu lagi hidup seperti bakteri dan alga yang ditemukan pada sumber-sumber air panas di taman Nasional Yellow Stone Amerika, suhu optimum untuk hidupnya sebesar 70°C (Brock, 1978).

d. Pengaruh pH

Selain suhu aktivitas enzim dipengaruhi oleh pH lingkungan tempat enzim tersebut bekerja. Banyak enzim yang sensitif terhadap perubahan pH dan setiap enzim memiliki pH optimum untuk aktivitasnya. Perubahan pH dapat menyebabkan berhentinya aktivitas enzim akibat proses denaturasi pada struktur tiga dimensi enzim (Palmer, 1985). Karena enzim dapat berbentuk ion positif, ion

negatif atau ion bermuatan ganda (*zwitter ion*). Dengan demikian perubahan pH lingkungan akan berpengaruh terhadap efektivitas bagian aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim substrat. Umumnya enzim bekerja optimum pada rentang pH 6-8, tetapi beberapa jenis organisme dapat hidup pada pH yang lebih rendah yang dikenal dengan istilah asidofil ataupun pada pH yang lebih tinggi yang dikenal dengan istilah alkalifil.

e. Pengaruh Inhibitor

Hambatan atau inhibisi pada suatu reaksi yang menggunakan enzim sebagai katalis dapat terjadi apabila penggabungan substrat pada bagian aktif enzim mengalami hambatan. Molekul atau ion yang dapat menghambat reaksi tersebut dinamakan inhibitor.

Penghambatan aktifitas enzim ada 3 tipe:

1. Inhibitor Kompetitif: zat penghambat mempunyai struktur yang mirip dengan substrat sehingga dapat bergabung dengan sisi aktif enzim. Terjadi kompetisi antara substrat dengan inhibitor untuk bergabung dengan sisi aktif enzim (*misal feed back effect*). Pada inhibisi kompetitif, kelajuan maksimal reaksi tidak berubah, namun memerlukan konsentrasi substrat yang lebih tinggi untuk mencapai kelajuan maksimal tersebut, sehingga meningkatkan K_m .
2. Inhibitor Non kompetitif: Inhibitor non-kompetitif dapat mengikat enzim pada saat yang sama substrat berikatan dengan enzim. Baik kompleks EI dan EIS tidak aktif. Karena inhibitor tidak dapat dilawan dengan peningkatan konsentrasi substrat, V_{max} reaksi berubah. Namun, karena substrat masih dapat mengikat enzim, K_m tetaplah sama.

3. **Inhibitor Unkompetitif:** Pada inhibisi tak kompetitif, inhibitor tidak dapat berikatan dengan enzim bebas, namun hanya dapat dengan kompleks ES. Kompleks EIS yang terbentuk kemudian menjadi tidak aktif. Jenis inhibisi ini sangat jarang, namun dapat terjadi pada enzim-enzim multimerik.

2.6. Enzim Amilase

Amilase merupakan enzim yang paling penting dan keberadaannya paling besar, pada bidang bioteknologi, enzim ini diperjualbelikan sebanyak 25% dari total enzim yang lainnya. Amilase didapatkan dari berbagai macam sumber, seperti tanaman, hewan dan mikroorganisme. Amilase yang berasal dari mikroorganisme banyak digunakan dalam industri, hal ini dikarenakan mikroorganisme periode pertumbuhannya pendek. Enzim amilase digunakan di industri farmasi, tekstil, detergen, pulp dan paling banyak di industri makanan. Enzim amilase dapat dikelompokkan ke dalam 3 kelompok:

a. Alpha amilase (α -amilase), EC.3.2.1.1

Nama lain dari enzim α -amilase adalah 1,4- α -D-glukan glukanohidrolase atau glukogenase. Enzim α -amilase menghidrolisis amilosa, glikogen, polisakarida dan yang lainnya melalui pemutusan ikatan α -1,4-glikosida secara acak. α -amilase memotong ikatan alfa-1,4 amilosa dan amilopektin yang menghasilkan produk akhir adalah dekstrin beserta sejumlah kecil glukosa dan maltosa. Alfa-amilase akan menghidrolisis ikatan alfa-1-4 glikosida pada polisakarida dengan hasil degradasi secara acak di bagian tengah atau bagian dalam molekul. Karena sifatnya yang dapat memutus ikatan glikosida secara acak, maka enzim ini bekerja lebih cepat dibanding amilase lainnya terutama β -amilase. Enzim α -amilase

banyak terdapat pada bakteri, jamur, tumbuhan dan hewan berperan besar dalam penguraian polisakarida.

α -amilase adalah enzim metaloenzim yang membutuhkan ion kalsium (Ca^{+2}) untuk aktivitas, integritas struktur dan untuk stabilitas (Bordbar dan Omidian, 2005). Enzim α -amilase dapat dibagi ke dalam 4 kelompok yaitu endoamilase memutus ikatan α -1,4, eksoamilase memutus ikatan α -1,4 atau α -1,6 dari residu glukosa eksternal, enzim pemutus cabang memutus ikatan α -1,6 dari rantai panjang polisakarida dan transferase memutuskan ikatan α -1,4 glikosida molekul donor dan mentransfer bagian donor kepada akseptor glikosida membentuk ikatan glikosida baru.

b. Beta amilase (β -amilase) , EC.3.2.1.2

Nama lain dari β -amilase adalah 1,4- α -D-glukan maltohidrolase; sakarogen amilase; glikogenase. β -amilase menginversi konfigurasi posisi atom C nomor 1 molekul glukosa dari alfa menjadi beta. Enzim ini memutus ikatan amilosa maupun amilopektin dari luar molekul dan menghasilkan unit-unit maltosa dari ujung nonpe-reduksi pada rantai polisakarida. Bila tiba pada ikatan alfa-1,6 glikosida aktivitas enzim ini akan berhenti. Enzim ini dijumpai pada kelompok tumbuhan, bakteri dan fungi. Enzim β -amilase mengkatalis reaksi hidrolisis ikatan kedua α -1,4 glikosida, memutus dua unit glukosa pada saat yang sama. Selama proses pematangan buah β -amilase bekerja memecah amilum menjadi gula sehingga buah yang matang terasa manis. Jaringan hewan tidak menghasilkan enzim β -amilase, kecuali bila ada mikroorganisme yang bersimbiosis di saluran pencernaannya.

c. Gamma amilase (γ -amilase), EC.3.2.1.3

Nama lain dari γ -amilase adalah glukon 1,4- α -glukosidase; amiloglukosidase; ekso-1,4- α glukosidase; lisosomal α -glukosidase; glukamilase; 1,4- α -D-glukan glukohidrolase. Enzim ini menghidrolisis ikatan glukosida alfa-1,4 dan menghidrolisis ikatan glikosida alfa-1,6 dan alfa-1,3 tetapi dengan laju yang lebih lambat dibandingkan dengan hidrolisis ikatan glikosida α -1,4 (Biogen, 2008).



Gambar 5. Tempat pemutusan enzim pada molekul amilosa (o= glukosa dan \emptyset =ujung pereduksi) (Turner, 2007)

2.7. Amplifikasi 16S rRNA

Gen 16S rRNA mengandung daerah konservatif yang ada pada setiap organisme dan dapat digunakan untuk mendesain primer, PCR ataupun untuk sekuensing. Gen ini selalu mengandung daerah-daerah spesifik yang dapat digunakan untuk identifikasi spesies. Oleh karena itu, analisa sekuens gen 16S rRNA menjadi teknologi ampuh untuk identifikasi isolat bakteri dalam diagnosa penyakit manusia. Metoda ini juga digunakan untuk mengidentifikasi dan menganalisa isolat-isolat bakteri lainnya yang ada di alam (Cai Hugh et. al 2003). Karakterisasi biologi molekuler telah banyak digunakan untuk mengidentifikasi

bakteri termofilik dan mesofilik. Sejak tahun 1980-an, sekuensing gen 16S rRNA telah digunakan untuk analisa filogenetik dan klasifikasi bakteri. Perbandingan komposisi rRNA dan jenis protein penyusun ribosom pada bakteri dan mamalia terlihat pada tabel 2 berikut:

Tabel 2. Perbandingan komposisi rRNA dan jenis protein penyusun ribosom pada bakteri dan mamalia

Sumber Ribosom	Ukuran Ribosom	Subunit Kecil	Subunit Besar
Bakteri	70S	30S, 16S RNA 21 protein	50S, 23S, 5S RNA 31 protein
Mamalia	80S	40S, 18S RNA 33 protein	60S, 28S, 58,5S, 5S RNA 49 protein

Gen 16S rRNA terletak pada small sub unit (SSU) ribosom. Peran penting yang dimiliki oleh 16S rRNA dalam proses translasi merupakan alasan utama penggunaannya sebagai kronometer molekuler. Perubahan struktur dan urutan rRNA dapat menyebabkan suatu organisme sulit melakukan translasi dan gagalnya produksi protein, maka rRNA menunjukkan derajat konsistensi yang tinggi (Woese, 1987). Gen 16S rRNA telah digunakan secara luas untuk mengidentifikasi spesies bakteri, hal ini dapat diketahui dari adanya ketidaksamaan dari dua buah sekuens pada spesies yang sama. Dari beberapa referensi, kesamaan sekuens 99-99,5% menunjukkan spesies yang identik dibandingkan dengan isolat yang mempunyai kesamaan sekuens kecil dari 97% yang berarti telah berbeda taksonominya. Untuk mendapatkan sekuens gen 16S rRNA digunakan primer universal untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA pada sel

bakteri (Fox GE et al 1992). Untuk mendapatkan sekuens gen 16S rRNA digunakan primer universal untuk mengamplifikasi gen 16S rRNA pada sel bakteri.

2.8. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Reaksi berantai polimerase (PCR= Polymerase Chain Reaction) pertama kali diperkenalkan oleh Kary Mullis pada tahun 1984. Perkembangan PCR selanjutnya dipacu oleh adanya penemuan enzim polimerase yang diekstraksi dari bakteri *Thermus aquaticus* oleh David Gelfant dan Susane Stoffel. enzim tersebut dikenal dengan nama komersial Taq-polymerase (Jamsari, 2007)

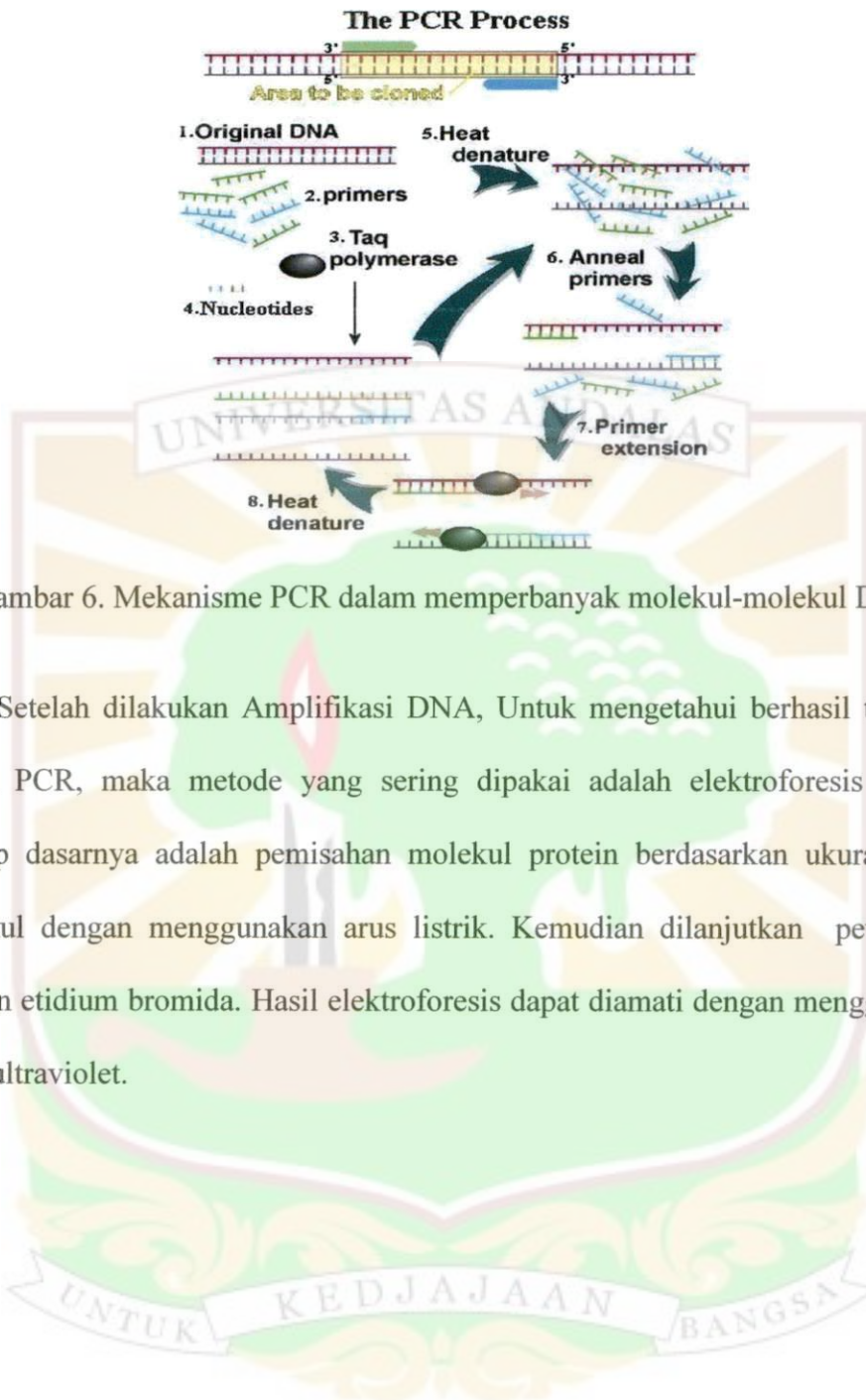
Prinsip dasar proses PCR adalah perbanyakan molekul-molekul spesifik DNA dengan bantuan primer-primer yang berupa oligonukleotida secara in vitro. Proses PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA bakteri BAL dengan menggunakan primer universal dikelompokkan lima tahap, tahap-tahap ini dapat dilihat pada gambar 2:

- *Denaturasi template* pada suhu 95°C selama 5 menit dengan DNA template.
- *Denaturasi kedua* pada suhu 95°C selama 5 menit dengan buffer
- *Annealing* (penempelan) pasangan primer pada untai tunggal DNA target 55°C selama 1 menit dengan dNTP.
- *Extension* (pemanjangan) yaitu polimerisasi dengan bantuan *Taq-Polymerase* pada suhu 72°C selama 3 menit dan primer forward dan reverse.
- *Final Extension* pada suhu 72 °C selama 7 menit dengan ddH₂O.

Material yang dibutuhkan dalam proses PCR adalah template yaitu molekul DNA yang akan dianalisis, primer berupa oligonukleotid yang didesain

berkomplemen dengan rantai DNA template dan menjadi titik batas multiplikasi segmen DNA target, Enzim DNA polymerase yang akan mensintesis sekuens DNA baru dengan menggunakan nukleotid-nukleotid bebas yang terdapat pada larutan reaksi, Larutan buffer mengandung garam magnesium chlorida ($MgCl_2$), Deoksinukleotid (dNTPs): deoxyNucleotida TriPhosphates (dATP, dCTP, dGTP & dTTP).

Secara ringkas, prinsip pelipatgandaan jumlah molekul DNA pada target yang diinginkan melalui teknik PCR dapat dijelaskan sebagai berikut. Pada suhu $95^{\circ}C$, molekul DNA mengalami denaturasi sehingga strukturnya berubah dari untai ganda menjadi untai tunggal. Pada suhu berkisar antara $50^{\circ}C$ sampai dengan $60^{\circ}C$, primer *forward* yang urutan nukleotidnya berkomplemen dengan salah satu untai tunggal akan menempel pada posisi komplemennya, demikian juga primer *reverse* akan menempel pada untai tunggal yang lainnya. Setelah kedua primer tersebut menempel pada posisinya masing-masing, enzim *polymerase* mulai mensintesis molekul DNA baru yang dimulai dari ujung 3' masing-masing primer. Sintesa molekul DNA baru ini terjadi pada suhu $72^{\circ}C$. Proses ini juga disebut sebagai ekstensi. Dengan demikian satu molekul DNA ganda akan berlipat jumlahnya menjadi dua molekul DNA. Setelah itu, diulang lagi proses denaturasi, penempelan dan sintesis pada suhu tersebut di atas dan seterusnya. Proses dari denaturasi, penempelan dan ekstensi disebut sebagai satu siklus. Suhu denaturasi dan ekstensi bersifat permanen, masing-masing pada $95^{\circ}C$ dan $72^{\circ}C$, sedangkan penempelan bergantung pada panjang-pendeknya primer. Proses PCR biasanya berlangsung 35-40 siklus. Seperti yang terlihat pada gambar berikut:



Gambar 6. Mekanisme PCR dalam memperbanyak molekul-molekul DNA

Setelah dilakukan Amplifikasi DNA, Untuk mengetahui berhasil tidaknya reaksi PCR, maka metode yang sering dipakai adalah elektroforesis dengan prinsip dasarnya adalah pemisahan molekul protein berdasarkan ukuran berat molekul dengan menggunakan arus listrik. Kemudian dilanjutkan pewarnaan dengan etidium bromida. Hasil elektroforesis dapat diamati dengan menggunakan sinar ultraviolet.

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus sampai dengan bulan Desember 2010 di Labor Bioteknologi BDP (Budi Daya Pertanian) Fakultas Pertanian Universitas Andalas di Padang.

3.2. Bahan dan Alat

3.2.1. Bahan

Kakao varietas *criollo*, *forastero* dan *Trinitario*, MRS Agar (Merck), MRS Broth (Merck), Pepton Water (Bacto), Nutrien Agar, Media Mueller Hinton, aquadest, spritus, alkohol, NaCl, HCl 1 N, NaOH 1 N, *crystal violet*, lugol iodin, aseton, safranin, *E.coli*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Ampicylin*, *Amoxilyn*, *Ciprofloxacin*, *Eritromicin*, *soluble starch* 1 %, buffer Posfat, DNS (Dinitro Salisilic Acid), BSA (Bovin Serum Albumin), reagen Lowry, buffer TE (Tris-EDTA), SDS 10%, Proteinase K, Phenol : Chloroform, sodium asetat, isopropanol, etanol 70 %, agarose, buffer TBE (TrisBoric-EDTA), Ethidium Bromide, loading dye, ddH₂O, primer, kit RTG dan Marker.

3.2.2. Alat

Autoklaf, *laminar air flow cabinet*, cawan petri, botol schot, tabung reaksi, erlenmeyer 250 ml, jarum ose, pipet tetes, lampu spritus, magnetic stirer, vortex, kertas cakram, tabung eppendorf 1,5 dan 2 ml, pipet mikro, tip mikro, Spektrofotometer UV-Vis, mesin PCR, alat elektroforesis, sentrifuge, spatula, oven, desikator, inkubator, shaker-inkubator, water bath, toples plastik, timbangan analitik, kertas label, kertas wrap, dan alat-alat lainnya

3.3. Prosedur dan Cara Kerja

3.3.1. Fermentasi Kakao

Buah Kakao varietas *criollo* (Red), *forastero* (Green) dan *Trinitario* (Hibrid) dipecah lalu diambil biji dan plasentanya kemudian dibungkus dengan daun pisang sehingga biji tersebut tertutup rapat. Setelah itu bungkus dimasukkan ke dalam toples plastik yang telah diberi lobang udara. Dilakukan fermentasi kakao dengan variasi waktu 36 dan 48 jam.

3.3.2. Sterilisasi Alat yang Digunakan

Alat gelas dibungkus dengan aluminium foil, pipet mikro diletakkan dalam wadahnya, ditutup rapat dan diberi selotip, tabung eppendof dimasukan kedalam *beaker glass*, lalu ditutup rapat dengan aluminium foil, kemudian disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C , tekanan 15 lb selama 15 menit. Jarum ose dan batang pengaduk disterilkan dengan membakarnya diatas api bunsen hingga membara, dibiarkan sebentar baru kemudian digunakan untuk setiap kali penggunaannya.

3.3.3. Persiapan dan Pembuatan Media

1. Pembuatan medium MRS Broth (Merck)

MRS broth ditimbang 52,2 gram dalam erlenmeyer 2000 mL, lalu dilarutkan dalam 1000 mL aquades, kemudian dipanaskan sampai homogen dan disterilkan pada suhu 121°C , tekanan 15 lb selama 15 menit.

2. Pembuatan media MRS Agar (Merck)

MRS broth ditimbang 52,2 gram dalam erlenmeyer 2000 mL lalu dilarutkan dalam 1000 mL aquades, dipanaskan sampai homogen, kemudian disterilkan pada

suhu 121°C , tekanan 15 lb selama 15 menit, selanjutnya dituang dalam cawan petri steril sebanyak 15 mL, lalu dibiarkan beberapa menit sampai medium membeku, kemudian disimpan dalam keadaan terbalik pada lemari pendingin.

3. Pembuatan media Pepton Water 10 % (Bacto)

Pepton Water ditimbang 10 gram dalam erlenmeyer 2000 mL dilarutkan dalam 1000 mL aquadest, kemudian dipanaskan sambil diaduk sampai benar-benar larut, kemudian dipindahkan ke dalam tabung eppendorf sebanyak 0,9 mL dan sterilkan pada suhu 121°C , tekanan 15 lb, selama 15 menit.

4. Pembuatan media Nutrient Agar (Merk)

Nutrien Agar ditimbang 28 gram dalam erlenmeyer 2000 mL, lalu dilarutkan dalam 1000 mL aquadest, dipanaskan sampai homogen kemudian disterilkan pada suhu 121°C , tekanan 15 lb selama 15 menit, selanjutnya dituang dalam cawan petri steril sebanyak 15mL, lalu dibiarkan beberapa menit sampai medium membeku, kemudian disimpan dalam keadaan terbalik pada lemari pendingin.

3.3.4 Pembuatan Reagen

1. Reagen Lowry

a. Lowry A : 2 % Na_2CO_3 dalam 0,1 N NaOH

Sebanyak 2,0 g Na_2CO_3 dilarutkan sampai 100 mL dengan 0,1 N NaOH.

b. Lowry B : 0,5 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam KNa tartarat 1%

Sebanyak 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam aquades sampai 100 mL. 1g KNa-tartarat dilarutkan sampai 100 mL dengan aquades. Keduanya dicampurkan dengan perbandingan 1 : 1

c. Lowry C

Sebanyak 50 mL Lowry A ditambah 1 mL Lowry B, dibuat baru setiap kali akan dipakai.

d. Lowry D

Sebanyak 1,25 mL larutan folin ciaocalteu 2 N diencerkan dalam labu ukur 25 mL dengan aquades.

2. Reagen DNS

Dibuat dengan cara menimbang 5 g NaOH, 91 g Kalium Natrium Tartrat 5 g Na₂SO₃ dan DNS dinitro salisilic acid) 5 g dan dilarutkan ke dalam air sampai dengan volume 500 ml. Campuran dihomogenkan dengan menggunakan magnetic stirrer. Larutan yang sudah jadi disimpan dalam botol gelap dan suhu rendah (Bernfeld, 1955).

3.3.5 Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Kakao

3.3.5.1. Proses Enrichment

Pulp kakao sebanyak 1 gram dicampurkan kedalam 9 mL MRS Broth (Merk) dengan perbandingan 1 : 9 (w/v) , lalu divortex hingga homogen kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.3.5.2. Proses Cereal Dilution

Setelah sampel diinkubasi dilakukan proses pengenceran bertingkat dengan cara mengambil 100µL sampel dari *enrichment*/10⁻¹ lalu ditambahkan kedalam tabung eppendorf yang berisi 900µL Pepton Water (Bacto) sehingga didapat pengenceran 10⁻² dan seterusnya hingga didapatkan pengenceran 10⁻⁹.

3.3.5.3. Proses Plating

Sampel yang mengandung bakteri diambil 100µL (0,1 mL) dari tabung eppendorf pada pengenceran 10⁻⁷ dan 10⁻⁹ lalu disemprotkan ke media MRS agar (Merck) dan diratakan dengan *hokey stick*, kemudian dimasukkan ke dalam jar anerobik dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 48 jam. Koloni BAL

tunggal yang tumbuh dipindahkan kembali ke dalam media MRS Agar (Merck) secara gores kemudian dimasukkan dalam desikator dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam untuk purnian dan identifikasi dengan pewarnaan gram.

3.3.6. Identifikasi Morfologi Bakteri Asam Laktat

3.3.6.1. Identifikasi Makroskopis

Dilakukan pengamatan terhadap bentuk, warna, tepian dan elevasi dari koloni bakteri probiotik yang tumbuh pada medium MRS Agar.

3.3.6.2. Identifikasi Mikroskopis

Dilakukan pengamatan terhadap bentuk sel dan identifikasi fisiologis bakteri probiotik dengan uji Gram. Prosedur uji Gram dimulai dengan menotolkan satu koloni bakteri pada kaca objek yang sebelumnya telah ditetaskan NaCl, kemudian diratakan dengan jarum ose membentuk bulatan. Kaca objek dipanaskan sampai NaCl yang telah mengandung koloni bakteri kering. Selanjutnya ditetaskan *crystal violet* pada objek dan dibiarkan 1 menit, dicuci dan dikover dengan larutan lugol iodine selama 1 menit. Kemudian dicuci dengan aquadest steril selama 5 detik setelah itu *decolorizing* dengan aseton atau etanol sampai tidak ada lagi warna ungu yang tersisa. Selanjutnya dicuci dengan aquadest steril selama 5 detik. Kemudian dikover dengan safranin selama 1 menit dan dicuci dengan aquadest steril selama 5 detik. Kaca objek dikeringkan dan dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali.

3.3.7. Uji Enzim Amilase

3.3.7.1. Uji Kualitatif

Kemampuan bakteri untuk menghidrolisa amilosa diuji di dalam medium Nutrient Agar yang mengandung 1% amilum. Plate diinkubasi pada suhu 37°C selama 24

24 jam. Adanya daerah bening disekitar koloni setelah penambahan Lugol iodin menunjukkan bahwa adanya aktifitas amilase.

3.3.7.2. Uji Kuantitatif

Bahan yang digunakan adalah isolat unggul pada uji kualitatif yang dikultur dalam larutan nutrien yang ditambahkan 1% *soluble starch*. Setelah itu ditambahkan larutan bufer posfat pH 7 yang kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit suhu 4°C dan diperoleh supernatan yang kemudian disebut Ekstrak Enzim Kasar (EEK).

Larutan standar maltosa

50 mg maltosa dilarutkan dalam 50 ml buffer HCl. Larutan tersebut kemudian diencerkan sehingga diperoleh stok standar dengan konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan stok tersebut dilakukan seri pengenceran sehingga diperoleh konsentrasi larutan standar maltosa 0 ppm; 100 ppm; 200 ppm; 300 ppm; 400 ppm; 500 ppm; 600 ppm. 1 ml larutan stok standar maltosa ditambah dengan 3 ml DNS, kemudian campuran larutan tersebut diinkubasi pada water bath dengan suhu 40°C selama 15 menit. Larutan didinginkan lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm. Dengan regresi linear, dari hasil absorbansi dan konsentrasi maltosa maka akan didapatkan persamaan matematik untuk standar maltosa yang akan digunakan pengukuran enzim.

Pengukuran aktivitas enzim

Pengukuran sampel

Dilakukan dengan cara menambahkan larutan 1,0 ml ekstrak enzim kasar ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 1,0 ml substrat *soluble starch* lalu divortex. Kemudian di inkubasi pada water bath dengan suhu 40°C selama 15 menit.

Setelah itu larutan ditambahkan 3,0 ml DNS, lalu di vortex, kemudian dipanaskan dengan air mendidih pada suhu 100°C selama 10 menit. Larutan didinginkan, lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm.

Pengukuran blanko

Dilakukan dengan penambahan 1,0 ml ekstrak enzim kasar pada 3 ml DNS dan 1,0 ml H_2O steril. Larutan divortex lalu diinkubasi dalam water bath dengan suhu 40°C selama 15 menit. Kemudian larutan dipanaskan pada air mendidih pada suhu 100°C selama 15 menit. Larutan didinginkan lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 550 nm.

Pembuatan kurva standar protein

Pada sederetan tabung reaksi ditambahkan 1 mL larutan standar protein BSA dengan variasi konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500 ppm. Selanjutnya ditambahkan 5,5 mL reagen Lowry C dan diaduk dengan magnetik stirer selama 5 menit. Setelah diinkubasi selama 30 menit, ditambahkan 1 mL reagen Lowry D dan segera diaduk dengan magnetik stirer. Kemudian didiamkan selama 30 menit dan dilanjutkan dengan pengukuran serapan pada panjang gelombang maksimum (685 nm). Sebagai blanko larutan standar diganti dengan akuades & perlakuannya sama dengan di atas.

Penentuan kadar protein sampel

Kadar protein sampel ditentukan dengan menggunakan kurva kalibrasi larutan standar. Sebanyak 1 mL sampel ditambahkan 5,5 mL reagen Lowry C kemudian diaduk dan selanjutnya ditambahkan 1 mL folin ciocalteu. Larutan tersebut didiamkan selama 30 menit, selanjutnya dilakukan pengukuran serapan pada panjang gelombang maksimum (685 nm).

3.3.8. Uji Potensi Probiotik

3.3.8.1. Uji Antimikroba

Uji aktivitas antimikroba dilakukan terhadap empat bakteri uji yaitu *E.coli*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* dan *Pseudomonas*. Metoda yang digunakan adalah difusi kertas cakram. Langkah pertama yang dilakukan adalah 3 mL isolat bakteri asam laktat disentrifuse dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit, kemudian supernatannya digunakan untuk uji aktivitas antimikroba. Dimasukkan 1 ose isolat bakteri ke dalam 10 mL akuades dihomogenkan dengan vortex. Kultur bakteri patogen diperlakukan sama dengan isolat bakteri asam laktat. 1 mL bakteri patogen di inokulasikan ke dalam media MH dengan metoda *spread* dan diratakan dengan hockey stick. Kertas cakram dimasukkan ke dalam cairan isolat dan di masukkan ke dalam media MH yang telah diinokulasi dengan bakteri patogen. Masukkan cakram antibiotik *Ampicylin*, *Amoxilyn*, *Ciprofloxacin* dan *Eritromicin* ke dalam media bersamaan dengan kertas cakram sampel. Dilakukan inkubasi selama 48 jam. Setelah itu baru dilihat zona beningnya dan bandingkan dengan kontrol.

3.3.8.2. Uji Resistensi Probiotik terhadap Asam

Diambil 1ose isolat murni, kemudian diinokulasikan ke dalam 3 mL MRS Broth dengan variasi pH 2-6 (dengan penambahan 1 N HCl atau NaOH) kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya distreak ke dalam plate MH yang sudah diinokulasi dengan *E.coli*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* dan *Pseudomonas*. Setelah itu diinkubasi selama 24 jam dan dilihat zona beningnya.

3.3.9. Isolasi DNA BAL Amilolitik yang berpotensi sebagai Probiotik

1. BAL Amilolitik+Probiotik Unggul ditanam dalam media MRS Broth cair kemudian shaker 1 hari di dalam tabung reaksi kecil
2. Ambil 2 mL masukkan ke dalam eppendorf
3. Sentrifuse dengan kecepatan 1400 rpm selama 3 menit
4. Ambil pellet kemudian tambahkan 500 μ L TE 1x, 40 μ L SDS dan 5 μ L Proteinase-K kemudian divortex
5. Inkubasi dalam water bath suhu 37° C selama 1 jam
6. +Phenol:Chloroform 500 μ L dan sentrifus 1400 rpm selama 3 menit
7. Ambil lapisan paling atas, pipet dan dekatkan ke dinding eppendorf
8. +Phenol:Chloroform 600 μ L lalu bolak balik sebanyak 3 kali dan disentrifus 1400 rpm selama 5 menit
9. Ambil lapisan paling atas (supernatan) lalu transfer ke eppendorf baru kemudian tambahkan Na.Acetat 1/10 dari volume yang ada
10. +Isopropanol dingin sebanyak 6/10 x 600 μ L
11. Sentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 1400 rpm
12. Lalu buang dan yang ada di eppendorf dicuci dengan etanol dingin 100 μ L
13. Keringkan dengan tissue
14. Larutkan dengan TE konsentrasi 20 μ L untuk meng-elusi pellet.

3.3.10. Amplifikasi Gen Pengkode 16S rRNA

DNA diamplifikasi menggunakan PCR 30 siklus. Primer yang digunakan :

Forward : AGAGTTTGATCCTGGCTAG

Reverse : AAGGAGGTGATCCAGCC

Total volume campuran untuk reaksi PCR 25 μ L untuk daerah gen pengkode 16S rRNA terdiri dari:

1. Kit RTG yang berisi Taq Polimerase & dNTP
2. + ddH₂O 21 μ L
3. + Primer 2 μ L
4. + Template 2 μ L

Setelah semua bahan tercampur kemudian dirunning PCR dengan 30 siklus selama 3 jam.

3.3.11. Gel Elektroforesis

Persiapkan gel agarosa 1 % (0,6 gram dalam 60 mL TBE) + Ethidium Bromida (merah) kemudian dinginkan. Setelah itu 2 μ L produk PCR ditambah TBE sampai terendam. Masukkan produk PCR ke dalam sumur gel termasuk marker 1 kb DNA Ladder (Fermentas). Dielektroforesis selama 30 menit pada 100 Volt. Gel kemudian dilihat di bawah lampu UV (Mustopa, 2009).

3.3.12. Sekuensing Nukleotida

Analisis data dilakukan dengan program software khusus. Sekuen dibandingkan dengan *database searches* yang terdapat pada NCBI *internet site* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) menggunakan program BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). *Phylogenetic tree* dari isolat yang diperoleh dibuat dengan menggunakan Clustal W.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

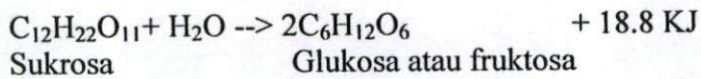
4.1 Fermentasi Kakao

Langkah awal yang dilakukan pada penelitian ini adalah proses pengambilan sampel kakao varietas *criollo* (Red), *forastero* (Green) dan *Trinitario* (Hibrid) di kawasan Lubuk Minturun Padang. Kemudian dilakukan pengupasan buah kakao dengan cara dipecah satu sama lain. Pemecahan buah dapat saja dilakukan dengan alat pemukul dari logam maupun non logam namun tidak dianjurkan pemecahan buah menggunakan benda tajam atau besi, karena dapat merusak biji dengan timbulnya warna hitam dan karat sehingga dapat merusak proses fermentasi. Setelah pengupasan dilakukan proses fermentasi pulp kakao dengan menggunakan daun pisang yang telah disterilkan agar bakteri lain yang terdapat pada daun pisang tersebut mati. Tempat fermentasi yang digunakan berupa kotak plastik yang memiliki lubang-lubang untuk mengeluarkan cairan dan sirkulasi udara.

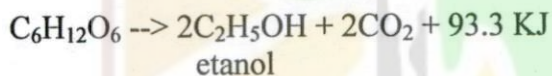
Fermentasi dilakukan selama 36 dan 48 jam untuk semua varietas karena waktu optimal untuk pertumbuhan bakteri asam laktat adalah pada rentang waktu tersebut (Ardhana, 2003). Hasil fermentasi setelah 36 jam tampak bagus pada varietas *Criollo* dan *Forastero*, sedangkan varietas *Trinitario* tampak berjamur karena terkontaminasi. Sebaliknya pada waktu fermentasi 48 jam tampak varietas *Criollo* dan *Forastero* berjamur sedangkan performa varietas *Trinitario* tampak bagus. Berdasarkan hal tersebut isolasi bakteri asam laktat dilakukan berdasarkan kondisi terbaik dari hasil fermentasi masing-masing varietas kakao.

Perubahan biokimia selama fermentasi dilakukan oleh mikroorganisme.

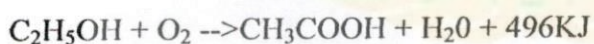
Pada 24 jam pertama enzim akan menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa sesuai dengan persamaan reaksi berikut:



Keberadaan asam sitrat dan kandungan gula yang tinggi dalam pulp akan memicu pertumbuhan ragi. Ragi akan mengubah gula dalam pulp menjadi alkohol dalam suasana anaerob. Aktivitas ini tidak akan berlangsung lama karena ragi akan mati disebabkan oleh panas akibat pemecahan sukrosa, glukosa, fruktosa dan gula sederhana lain yang menimbulkan energi panas, sesuai dengan persamaan reaksi berikut:



Fermentasi aerob akan diinisiasi oleh bakteri asam asetat pada waktu fermentasi 12 jam. Selama pemecahan etanol akan dihasilkan panas oleh bakteri asam asetat dan terbentuk asam organik dalam reaksi eksotermik yang dapat meningkatkan suhu menjadi 50°C. Peningkatan suhu inilah yang merupakan salah satu alasan kenapa ragi hanya ditemui pada tahap awal fermentasi. Adapun reaksi pemecahan etanol menjadi asam asetat tersebut seperti terlihat pada persamaan reaksi berikut.



Bakteri asam laktat akan tumbuh signifikan pada hari kedua fermentasi dan populasi optimal akan tumbuh pada waktu 36 dan 48 jam. Saat ini secara umum bakteri asam laktat telah diterima memiliki peran utama di dalam ekologi mikroba fermentasi kakao. Bakteri asam laktat memetabolisme gula dengan mekanisme homofermentatif dan heterofermentatif, menghasilkan asam laktat

dalam jumlah besar yang akan mempengaruhi keasaman dan kualitas dari biji kakao (Ardhana, 2003).

Setelah fermentasi berlangsung pulp kakao mengalami perubahan pH dari 3,9 menjadi 4,5. Hal demikian terjadi karena berdifusinya asam asetat maupun asam laktat yang terbentuk selama fermentasi ke dalam biji dan membuat biji tidak berkecambah (Chong et al., 1978). Pada awal fermentasi biji kakao berwarna putih kekuningan dan berbau manis asam namun setelah cairan keluar warna pulp akan menjadi putih kotor dan selama fermentasi pulp berlangsung bau asam akan menyeruak karena asam asetat dan asam laktat yang dihasilkan selama fermentasi.

4.2. Isolasi Bakteri Asam Laktat

Prinsip isolasi bakteri adalah memisahkan suatu mikroba dari mikroba lainnya sehingga diperoleh kultur murni. Isolasi Bakteri Asam Laktat diawali dengan melakukan inokulasi sampel pada medium pengaya (*enrichment*) *de Mann, Rogosa, Sharpe Broth* (MRSB) kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam desikator. Pengayaan dalam MRSB dapat meningkatkan jumlah koloni BAL secara cepat sehingga jumlahnya lebih banyak. Hal ini terjadi karena MRSB secara umum diaplikasikan sebagai media pertumbuhan bakteri asam laktat dan mempunyai nilai pH optimum untuk pertumbuhan BAL yaitu 5,7 yang dapat menekan pertumbuhan sebagian besar mikroorganisme lain kecuali BAL. Inkubasi dilakukan pada suhu dan waktu yang sesuai dan dibuat sedemikian rupa yang disesuaikan dengan sifat mikroba. Bakteri asam laktat merupakan bakteri mesofilik dimana aktifitas pertumbuhannya pada suhu medium yaitu pada suhu

30°C - 40°C (Alexander, 1977). Bakteri asam laktat dapat hidup pada saluran pencernaan manusia karena pertumbuhan optimumnya adalah pada suhu 37°C yang merupakan temperatur normal tubuh manusia. Selanjutnya inkubasi bakteri asam laktat dilakukan selama 24 jam karena umumnya pada waktu tersebut merupakan fasa logaritmik dimana pembiakan bakteri berlangsung paling cepat dan menunjukkan pertumbuhan sel tertinggi.

Bakteri dalam sampel dengan metoda pengenceran bertingkat. Tahap pengenceran menggunakan Pepton Water (Bacto) karena mengandung pepton yang merupakan sumber karbon, nitrogen, vitamin, dan mineral untuk menggiatkan lagi sel-sel bakteri yang mungkin kehilangan vitalitasnya karena kondisi di dalam sampel yang kurang menguntungkan. Pepton Water juga mengandung sodium klorida yang dapat mempertahankan keseimbangan osmotik larutan. Pengenceran dilakukan sampai 10^{-7} dalam Pepton Water (Bacto) agar konsentrasi bakteri semakin kecil dan ketika diinokulasi ke media MRS Agar akan terbentuk koloni-koloni yang terpisah sehingga didapatkan isolat yang tidak TNTC (Too Numerous To Count).

Setelah pengenceran dilakukan isolasi bakteri selanjutnya dengan inokulasi sampel ke dalam media MRS Agar dengan metoda tuang dan diratakan dengan hockey stick kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Beberapa koloni bakteri asam laktat tunggal akan didapatkan yang dianggap sebagai variasi isolat. Setelah itu dilakukan pemurnian isolat bakteri asam laktat dengan cara menstreak koloni-koloni tunggal (*single colony*) ke dalam media

MRS Agar. Kultur murni yang diperoleh dari tiga varietas kakao adalah sebanyak 20 isolat dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Isolasi Bakteri Asam Laktat

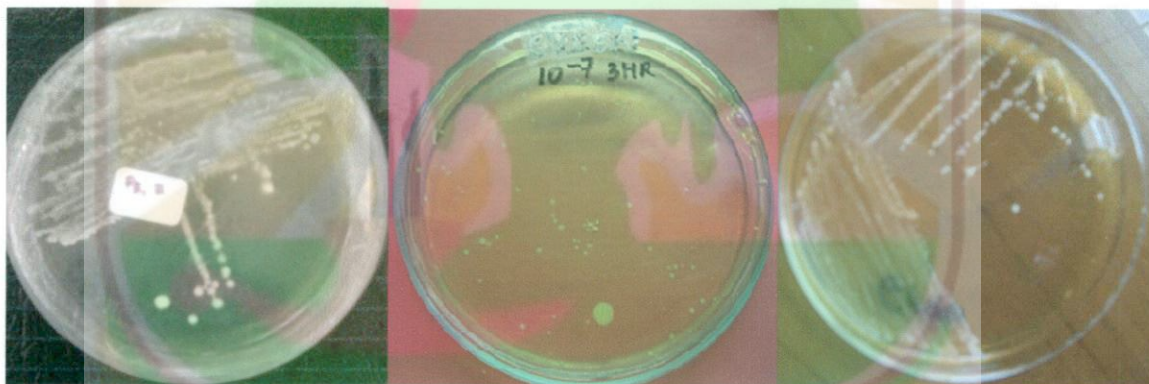
No	Kode Isolat	Sumber
1	R1	<i>Criollo</i>
2	R2	<i>Criollo</i>
3	R3	<i>Criollo</i>
4	R4	<i>Criollo</i>
5	R5	<i>Criollo</i>
6	R6	<i>Criollo</i>
7	G1	<i>Forastero</i>
8	G2	<i>Forastero</i>
9	G3	<i>Forastero</i>
10	G4	<i>Forastero</i>
11	G5	<i>Forastero</i>
12	G6	<i>Forastero</i>
13	H1	<i>Trinitario</i>
14	H2	<i>Trinitario</i>
15	H4	<i>Trinitario</i>
16	H4	<i>Trinitario</i>
17	H5	<i>Trinitario</i>
18	H6	<i>Trinitario</i>
19	H7	<i>Trinitario</i>
20	H8	<i>Trinitario</i>

4.3. Identifikasi Morfologi BAL

4.3.1. Identifikasi makroskopis

Kegiatan identifikasi makroskopis yaitu dengan melakukan pengamatan terhadap ukuran dan bentuk koloni bakteri, permukaan/elevasi, warna, dan bentuk pinggir dari bakteri secara visual.

Berdasarkan identifikasi bentuk koloni BAL, penampakan ke-20 koloni BAL pada media MRS Agar berbentuk bundar, berwarna putih susu dengan tepian licin dan elevasi cembung (Gambar 7 dan lampiran 10) dan ukuran koloni bakteri ada yang sedang, kecil dan besar (lampiran 11)



R

G

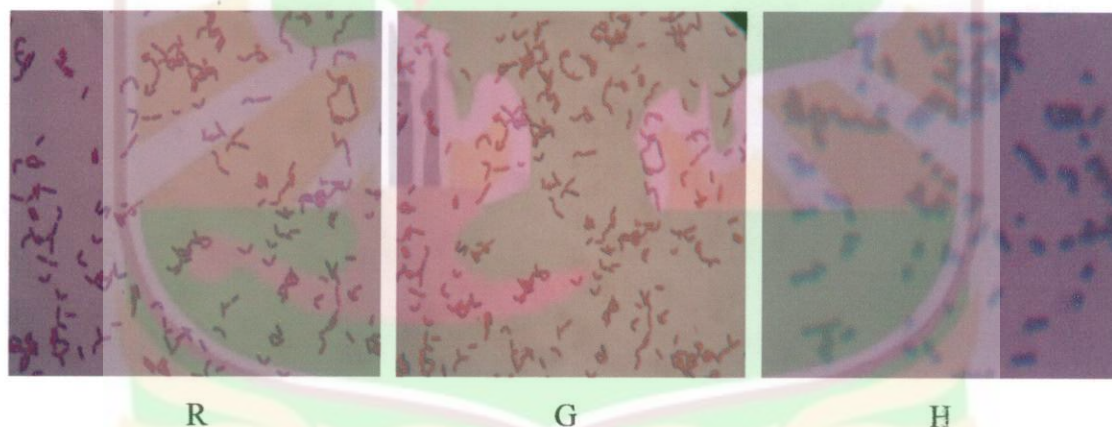
H

Gambar 7. Penampakan BAL pada Medium MRS Agar

Koloni BAL pada media MRS Agar yang ditemukan pada penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Komang dkk (2005) menyatakan bahwa karakterisasi morfologi isolat BAL berdasarkan warna menunjukkan bahwa koloni berwarna putih susu dengan bentuk bundar.

4.3.2. Identifikasi Mikroskopis

Kegiatan identifikasi mikroskopis yaitu dengan melakukan pewarnaan Gram pada koloni tunggal (*single colony*) bakteri yang didasarkan pada tebal atau tipisnya lapisan peptidoglikan di dinding sel dan banyak sedikitnya lapisan lemak pada membran sel bakteri. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang tebal dan membran sel selapis serta tidak memiliki membran luar (*outer membrane*). Sedangkan bakteri Gram negatif mempunyai dinding sel tipis yang berada diantara dua lapis membran sel. Gambar 8 menunjukkan hasil pewarnaan Gram dari Bakteri asam laktat untuk varietas *criollo* (Red), *forastero* (Green) dan *Trinitario* (Hibrid).



Gambar 8 . Pewarnaan Gram positif dari BAL

Dari hasil pewarnaan Gram diatas didapatkan bakteri Gram positif berbentuk bacil dan coccus dengan warna biru keunguan. Warna ungu dari pewarnaan Gram positif terjadi karena bakteri tersebut menyerap warna dari kristal violet. Hal ini sesuai dengan pernyataan Unus (2005) yang menyatakan bahwa bakteri Gram positif akan mengambil warna kristal violet yang berwarna ungu walaupun sudah dicuci dengan alkohol dan ketika diberi safranin yang

berwarna merah, bakteri tersebut tetap akan berwarna ungu sedangkan warna merah menunjukkan Gram negatif. Hal ini disebabkan juga karena perbedaan peptidoglikan dan permeabilitas membran organisme Gram positif memiliki dinding sel yang cukup tebal (20-80 nm) dan terdiri atas 60 sampai 100 persen peptidoglikan, bersifat kompak dan kurang permeabel sehingga pada saat pemberian kristal violet, maka zat warna tersebut memasuki dinding sel dan pada saat pencucian dengan alkohol, warna ungu yang telah terikat tersebut tidak bisa keluar lagi karena dinding sel yang kompak dan kurang permeabel sehingga warna safranin tidak bisa lagi mewarnai bakteri Gram positif, sebaliknya dinding sel Gram negatif mengandung lebih sedikit peptidoglikan (10 sampai 20 persen), kurang kompak dan lebih permeabel. Pada saat pemberian kristal violet yang berwarna ungu, maka zat warna tersebut akan larut pada saat pencucian dengan alkohol, dan pada saat pemberian safranin maka zat warna tersebutlah yang mewarnai bakteri Gram negatif. Dari Tabel 4 dapat dilihat hasil uji Gram dan pengamatan morfologi di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x dari 20 isolat BAL

Tabel 4 . Hasil uji Gram dan morfologi isolat BAL

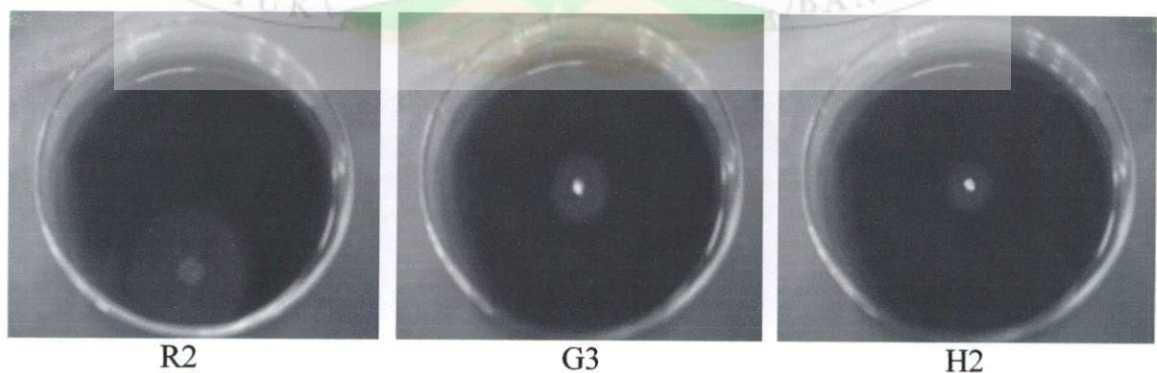
No	Kode Isolat	Gram	Morfologi
1	R1	+	bacillus
2	R2	+	bacillus
3	R3	+	coccus
4	R4	+	bacillus
5	R5	+	bacillus
6	R6	+	coccus
7	G1	+	bacillus

8	G2	+	bacillus
9	G3	+	bacillus
10	G4	+	coccus
11	G5	+	coccus
12	G6	+	coccus
13	H1	+	coccus
14	H2	+	coccus
15	H3	+	coccus
16	H4	+	coccus
17	H5	+	coccus
18	H6	+	coccus
19	H7	+	coccus
20	H8	+	coccus

4.4. Uji Enzim Amilase

4.4.1. Uji Kualitatif

Uji kualitatif enzim amilase dilakukan dengan melakukan skrining enzim ekstraseluler dari isolat bakteri yang diperoleh (20 isolat). Masing-masing kultur murni bakteri asam laktat yang diperoleh diinokulasi di dalam medium Nutrien Agar yang mengandung 1% *soluble starch*. Hasil skrining enzim amilase dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 9. Skrining zona bening terluas

Ketika semua isolat bakteri ditumbuhkan dalam medium *nutrient starch agar* pada waktu inkubasi 1x24 jam, hanya 7 isolat yang tumbuh dengan menghasilkan zona bening (lampiran 12) setelah disiram larutan iodin, yaitu isolat R2, R4, G3, G5, H2, H3 dan H4. Hal ini menunjukkan bahwa 7 buah isolat tersebut menghasilkan enzim ekstraseluler amilase. Isolat R2, G3 dan H2 menghasilkan zona bening paling tinggi, yaitu 2,5, 1,5 dan 1,3 cm. Zona bening yang dihasilkan dalam waktu 2x24 jam dan 3x24 jam dapat dilihat pada lampiran 12.

Molekul amilosa terdiri dari polimer glukosa yang dihubungkan oleh ikatan α 1-4 dan kadang-kadang mempunyai ikatan α 1-6, ikatan tersebut dapat dihidrolisis oleh amilase untuk menghasilkan dekstrin, glukosa dan maltosa. Larutan iodin bisa digunakan sebagai indikator ada tidaknya molekul amilosa karena iodin akan membentuk kompleks berwarna biru kehitaman dengan amilosa. Munculnya zona bening di sekitar koloni bakteri karena molekul amilosa telah dipecah oleh amilase sehingga larutan iodin tidak membentuk kompleks lagi dengan amilosa.

4.5.2. Uji Kuantitatif

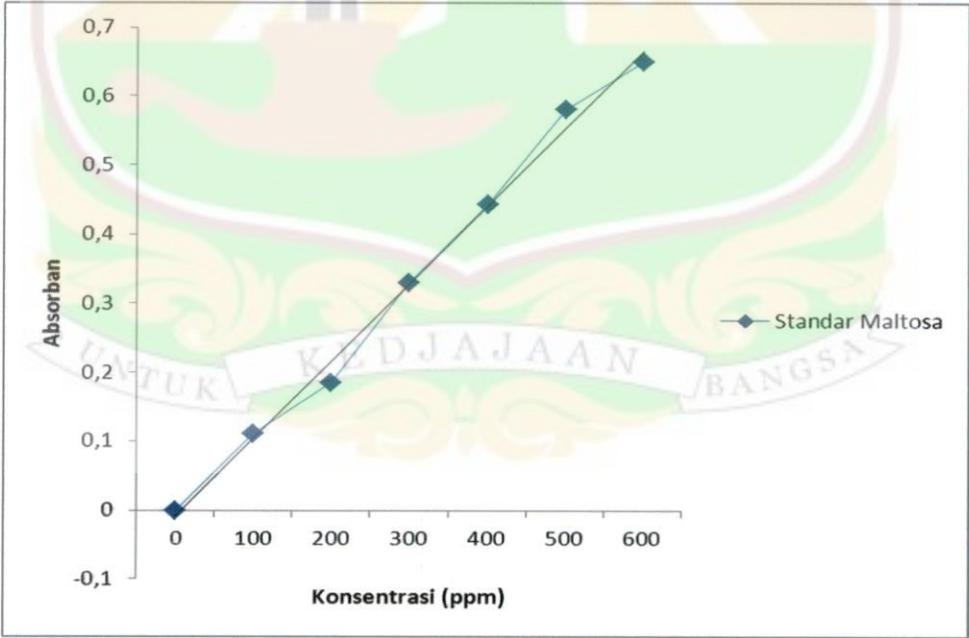
Pengukuran aktivitas enzim amilase dilakukan terhadap 3 isolat yang memiliki zona bening tertinggi pada uji kualitatif di atas yaitu R2, G3 dan H2. Untuk memproduksi enzim amilase digunakan *soluble starch* sebagai substrat. Penggunaan substrat berfungsi untuk menginduksi bakteri untuk menghasilkan enzim amilase. Karena substrat diperlukan dalam proses produksi enzim, maka enzim amilase yang diproduksi dari bakteri asam laktat dikatakan sebagai *inducible enzyme*.

Pada pemeriksaan aktivitas enzim amilase dilakukan pengukuran kadar maltosa untuk pembuatan kurva standar dengan menggunakan *soluble starch* sebagai substrat. Dari pengukuran spektrofotometri diperoleh data sebagai berikut:

Tabel 5. Nilai Absorbansi standar Maltosa

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
0,0	0,0
100	0,110
200	0,185
300	0,330
400	0,443
500	0,580
600	0,650

Dari data di atas dapat dibuat kurva standar maltosa seperti gambar berikut ini :



Gambar 10. Kurva standar maltosa

Dari gambar di atas diperoleh persamaan matematis dimana $x = y - 0,028 / 0,001$ dimana x adalah konsentrasi maltosa dan y merupakan nilai absorbansi dari maltosa pada panjang gelombang 550 nm. Konsentrasi maltosa dari sampel didapatkan dengan memasukkan nilai absorbansi dari R2, G3 dan H2 ke persamaan regresi di atas. Selanjutnya ditentukan Aktivitas enzim amilase dengan Rumus sebagai berikut :

$$AE = \frac{MG \times 1000}{BMg \times MI} \dots\dots\dots(Kombong, 2004)$$

dimana :

AE = Aktifitas enzim (Unit/mL filtrat enzim)

MG = Miligram glukosa yang dihasilkan dari reaksi hidrolisa pati

BMg = Berat Molekul Glukosa = 360,31

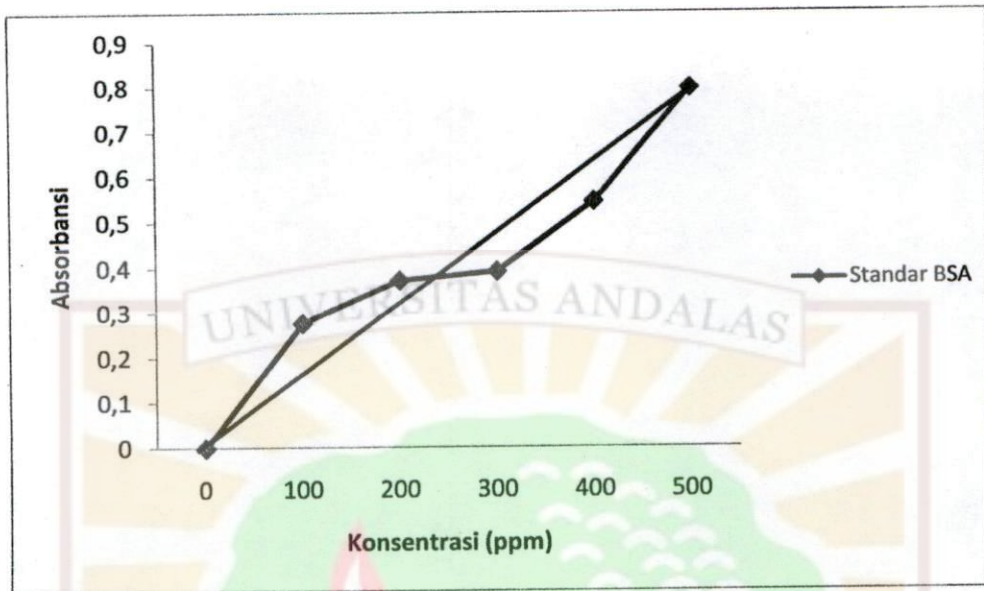
MI = Masa Inkubasi = 15 menit

Setelah itu diukur pula konsentrasi protein terlarut pada ekstrak enzim kasar dengan menggunakan larutan Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai standar untuk mengukur kadar protein terlarut. Data pembuatan Standar BSA pada panjang gelombang 685 nm adalah sebagai berikut :

Tabel 6. Nilai Absorbansi standar BSA

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
0,0	0,0
100	0,276
200	0,372
300	0,392
400	0,545
500	0,796

Dari data di atas dapat dibuat kurva standar BSA seperti gambar berikut ini :



Gambar 11. Kurva Standar protein BSA

Dari gambar di atas diperoleh persamaan matematis dimana $x = y - 0,147 / 0,001$ dimana x adalah konsentrasi protein sampel dan y merupakan nilai absorbansi dari protein pada panjang gelombang 685 nm. Kadar protein sampel ditentukan dengan cara memasukkan nilai absorbansi R2, G3 dan H2 ke persamaan regresi di atas.

Dari ke-2 persamaan regresi di atas dapat diperoleh data sebagai berikut :

Nama Isolat	A1	A2	B	X1	X2	U/mL	U/mg
R2	0,036	0,870	0	8	723	1,480	2,047
G3	0,034	0,887	0	6	740	1,110	1,500
H2	0,032	0,891	0	4	744	0,740	0,995

Dimana A1 adalah nilai absorbansi dari sampel, A2 adalah absorbansi dari protein, B adalah blanko sedangkan X1 nilai dari konsentrasi maltosa dalam ppm dan X2 nilai dari konsentrasi protein dalam ppm. Sedangkan U/mL adalah unit aktivitas enzim amilase dan U/mg adalah aktivitas spesifik dari enzim amilase dengan rumus :

$$\text{Aktivitas Spesifik Enzim} = \frac{\text{Aktivitas Enzim (unit/mL)}}{\text{Kadar protein (mg/mL)}}$$

Dari ketiga Aktivitas spesifik yang didapatkan dari masing-masing isolat dapat dilihat bahwa R2 memiliki aktivitas spesifik yang tertinggi dibandingkan dengan isolat yang lain yakni 1,50 U/mg. nilai ini sangat kecil apabila dibandingkan dengan hasil yang diperoleh Dheeran dkk yaitu 14.5 U/mg, Marlida dkk yaitu 86 U/mg dan Chakraborty dkk yaitu 11.5 U/mg. Hal ini dapat dikarenakan belum ditentukannya waktu optimum, suhu, dan kondisi yang dapat meningkatkan hasil enzim dalam pemanenan ekstrak enzim kasar seperti penambahan vitamin dan suplemen bakteri.

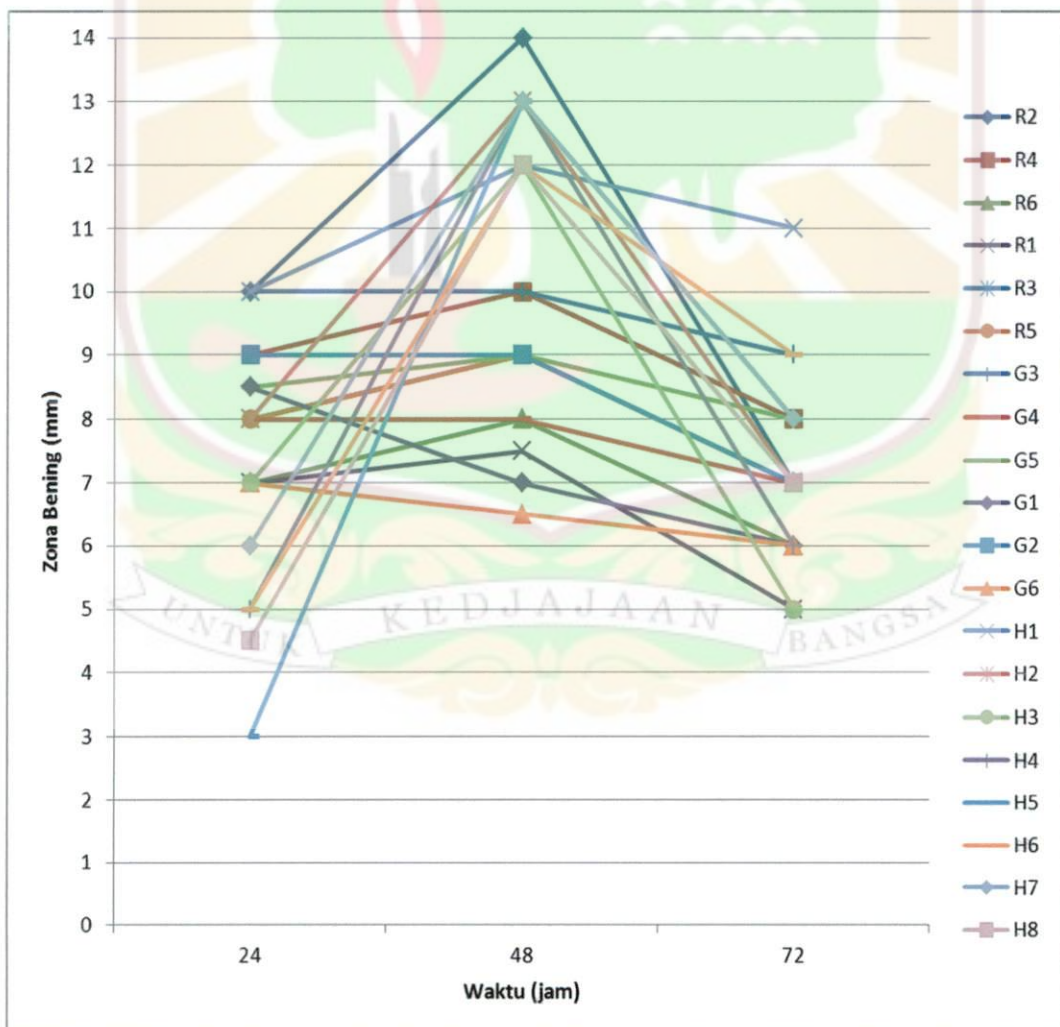
Apabila telah dilakukan optimasi dan produksi enzim yang dihasilkan meningkat sampai pada level tertentu, protein terlarut yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim spesifik dapat dikurangi dengan cara pemurnian enzim yaitu bisa dengan dialisis, kromatografi penukar ion atau dengan ultra filtrasi sehingga aktivitas enzim spesifik dari produk yang dihasilkan dapat ditingkatkan.

4.5. Uji Potensi Probiotik

4.4.1. Uji Anti Mikroba

Uji aktivitas antimikroba dimaksudkan untuk menguji kemampuan bakteri asam laktat sebagai probiotik dalam menghambat pertumbuhan beberapa bakteri patogen yang bisa menimbulkan penyakit. Bakteri patogen yang digunakan dalam penelitian ini adalah *E.coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* (koleksi Labor Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Unand). Hasil uji antimikroba dapat dilihat pada lampiran 15.

Grafik hasil pengamatan zona bening dapat dilihat pada gambar berikut :



Gambar 12. Grafik hasil pengamatan zona hambat 20 isolat BAL terhadap *E.coli* (mm). Diameter kertas cakram = 5 mm.

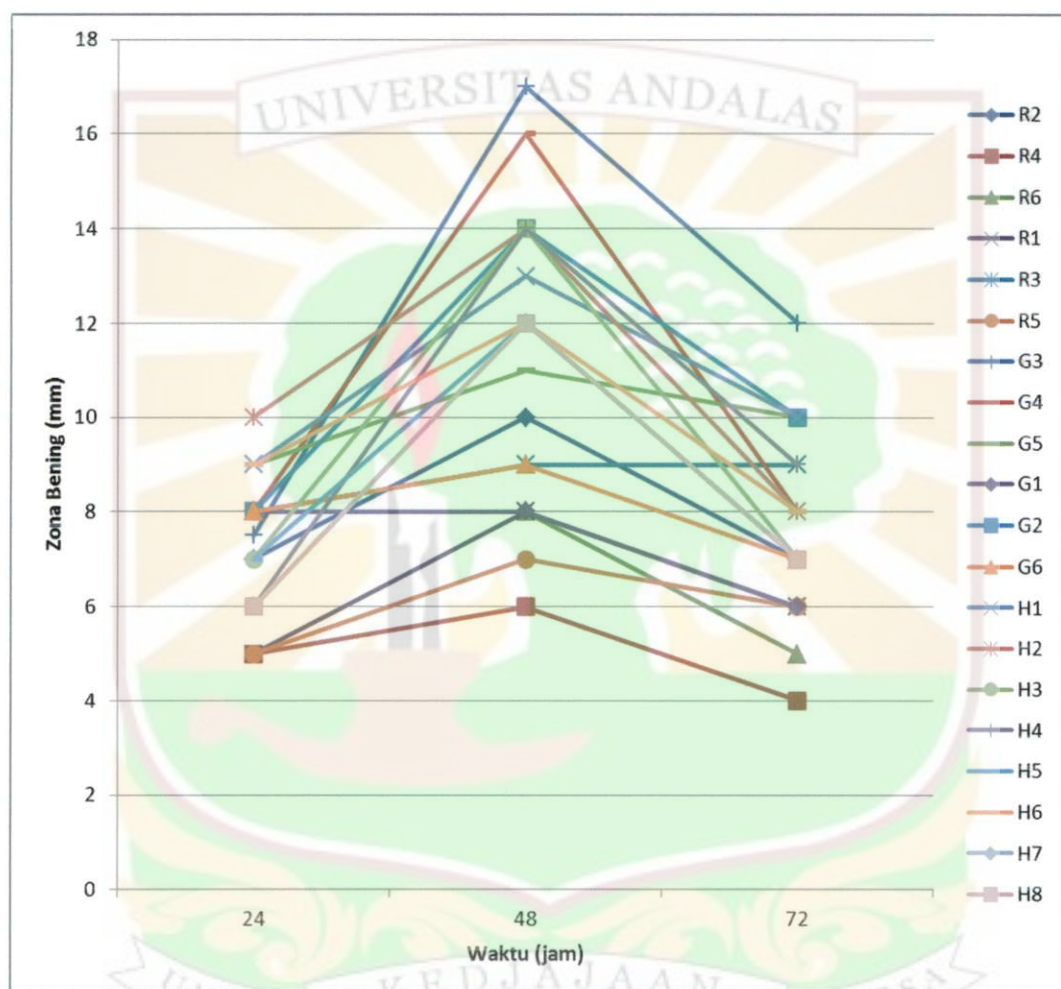
Uji aktivitas antimikroba dilakukan terhadap 20 supernatan isolat. Dari Gambar 12 dapat dilihat bahwa kemampuan supernatan isolat dalam menghambat pertumbuhan *E.coli*, berbeda-beda. Pada awal pertumbuhan sel bakteri akan beradaptasi terlebih dahulu dengan medium pertumbuhannya yang disebut sebagai fasa lag (fase adaptasi). Panjang fasa lag tergantung pada macam jasad renik dan kondisi pertumbuhan bakteri, misalnya komposisi medium, faktor lingkungan dan sebagainya. Setelah itu bakteri akan memasuki fase pertumbuhan yang lebih cepat yang disebut fase logaritmik (fase eksponensial). Secara umum dapat dilihat pada kurva bahwa zona bening paling besar terdapat pada waktu inkubasi 2x24 jam. Lamanya waktu pertumbuhan dari semua isolat bakteri tersebut disebabkan karena media MH (*Mueller Hinton*) yang digunakan bukan merupakan media yang spesifik untuk pertumbuhan BAL melainkan media spesifik untuk Antibiotik. Selain itu setiap bakteri memiliki karakteristik yang berbeda-beda sehingga cepat lambatnya fase eksponensial dari bakteri pun tentu berbeda. Kemudian dari kurva juga dapat dilihat bahwa pada waktu 3x24 jam semua zona bening dari isolat bakteri mengalami penyusutan. Hal ini disebabkan karena pertumbuhan bakteri telah dikalahkan oleh bakteri patogen (*E.coli*) yang digunakan. Dari kurva di atas dapat dilihat bahwa bakteri yang memiliki zona hambat paling besar pada waktu inkubasi 2x24 jam besar untuk *E.coli* yaitu isolat R2 dengan diameter 14 mm.

Klasifikasi Respon Hambatan Pertumbuhan Bakteri (Mardiana 2007)

Diameter Zona Bening	Respon Hambatan Pertumbuhan
≤ 5 mm	Lemah
5-10 mm	Sedang
10-20 mm	Kuat
≥ 20 mm	Sangat Kuat

Berdasarkan klasifikasi di atas dapat dianggap bahwa isolat R2 memiliki respon hambatan yang kuat. Jika diaplikasikan sebagai probiotik maka dapat dilakukan 2 x 24 jam agar efektif menghambat pertumbuhan *E.coli*.

Selanjutnya grafik uji antimikroba terhadap bakteri patogen *Streptococcus* adalah:

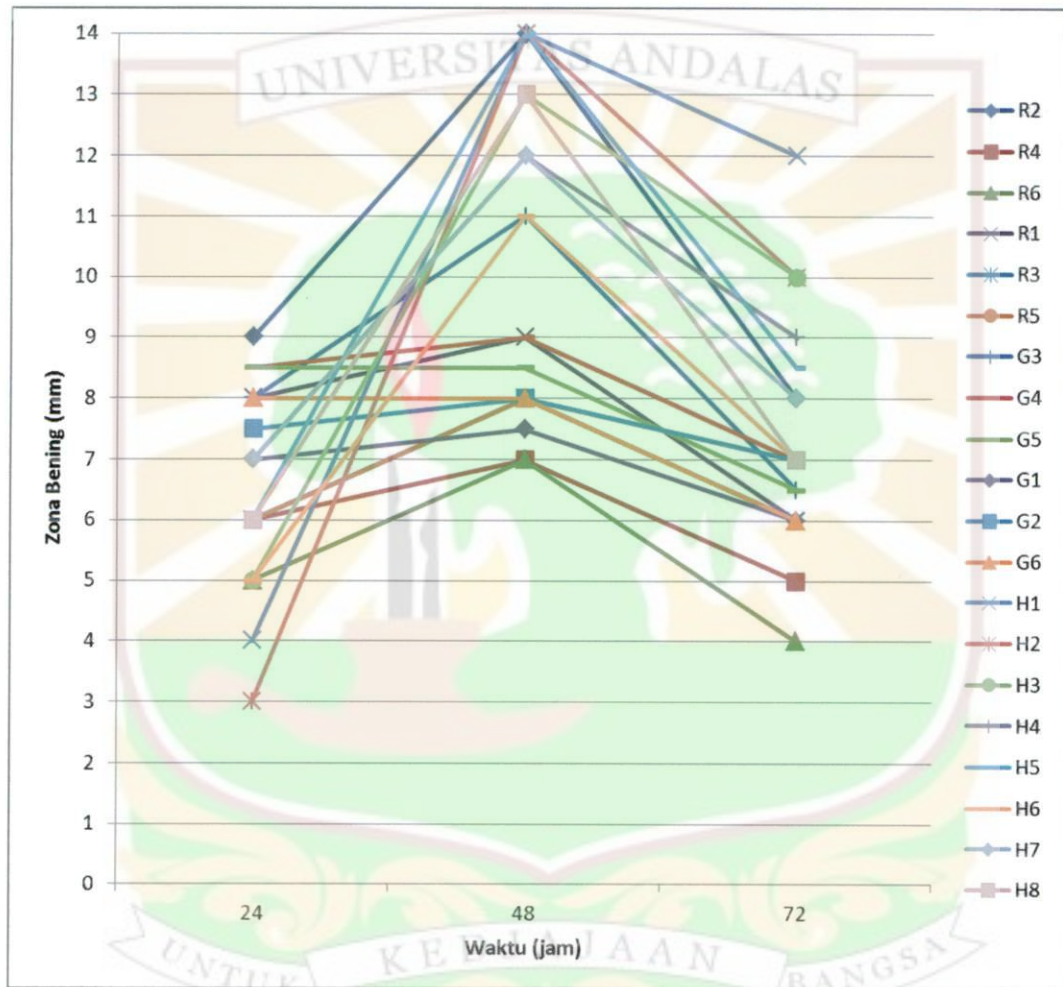


Gambar 13. Grafik hasil pengamatan zona hambat 20 isolat BAL terhadap *Streptococcus* (mm). Diameter kertas cakram = 5 mm.

Uji aktivitas antimikroba dilakukan terhadap 20 supernatan isolat. Dari Gambar 13 dapat dilihat bahwa kemampuan supernatan isolat dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus* berbeda-beda. Supernatan isolat R4 punya zona bening paling kecil. Sementara supernatan isolat G3 pada waktu pengamatan 2x24

jam mempunyai zona hambat paling besar untuk *Streptococcus*. Jika diaplikasikan sebagai probiotik maka dapat dilakukan 2x24 jam agar efektif menghambat pertumbuhan *Streptococcus*.

Selanjutnya grafik uji antimikroba terhadap bakteri patogen *Staphylococcus* adalah:

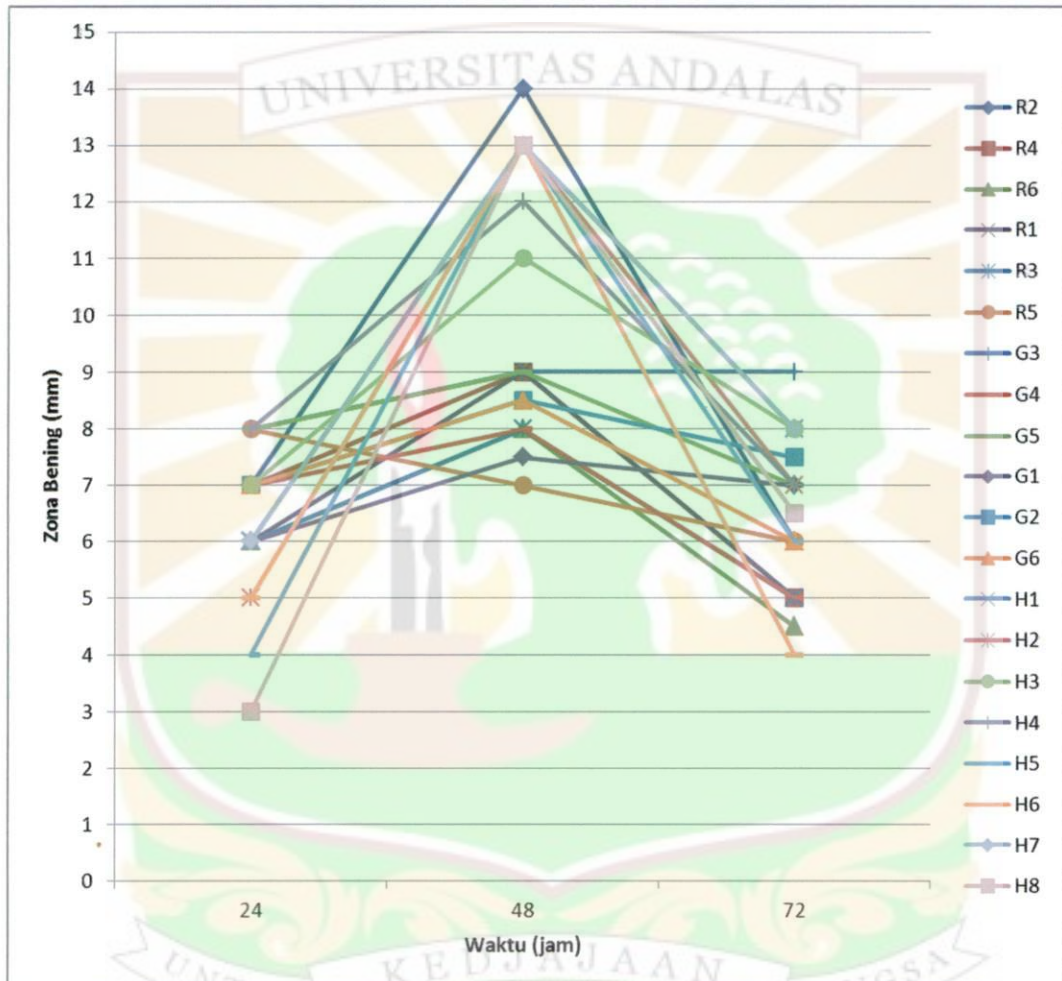


Gambar 14. Grafik Hasil Pengamatan Zona Hambat 20 isolat BAL terhadap *Staphylococcus* (mm). Diameter kertas cakram = 5 mm.

Uji aktivitas antimikroba dilakukan terhadap 20 supernatan isolat. Dari Gambar 14 dapat dilihat bahwa kemampuan supernatan isolat dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus* berbeda-beda. Supernatan isolat R6 punya zona bening paling kecil. Sementara supernatan isolat R2, H1, H2 dan H5 pada waktu

pengamatan 48 jam mempunyai zona hambat paling besar untuk *Staphylococcus*. Jika diaplikasikan sebagai probiotik maka dapat dilakukan 2 x 24 jam agar efektif menghambat pertumbuhan *Staphylococcus*.

Selanjutnya grafik uji antimikroba terhadap bakteri patogen *Pseudomonas* adalah:



Gambar 15. Grafik hasil pengamatan zona hambat 20 isolat BAL terhadap *Pseudomonas* (mm). Diameter kertas cakram = 5 mm.

Uji aktivitas antimikroba dilakukan terhadap 20 supernatan isolat. Dari Gambar 15 dapat dilihat bahwa kemampuan supernatan isolat dalam menghambat pertumbuhan *Pseudomonas* berbeda-beda. Supernatan isolat R5 punya zona bening paling kecil. Sementara supernatan isolat R2 pada waktu pengamatan 2x24

jam mempunyai zona hambat paling besar untuk *Pseudomonas*. Jika diaplikasikan sebagai probiotik maka dapat dilakukan 2x24 jam agar efektif menghambat pertumbuhan *Pseudomonas*.

Dengan adanya fakta diatas maka dapat dilihat bahwa supernatan isolat R2 paling efektif dalam menghambat tiga bakteri uji patogen *E.coli*, *Staphylococcus* dan *Pseudomonas*. Dengan demikian isolat R2 dapat digunakan sebagai biosuplemen probiotik yang dapat menurunkan pertumbuhan bakteri patogen seperti *E.coli*, *Staphylococcus* dan *Pseudomonas* sehingga dapat mengembalikan keseimbangan mikroflora (rasio antara bakteri patogen dan nonpatogen) dalam saluran pencernaan terutama pada usus sehingga nutrisi, vitamin, dan elemen penting lainnya bisa diserap secara sempurna dalam tubuh.

4.5.2. Uji Resistensi Terhadap Asam

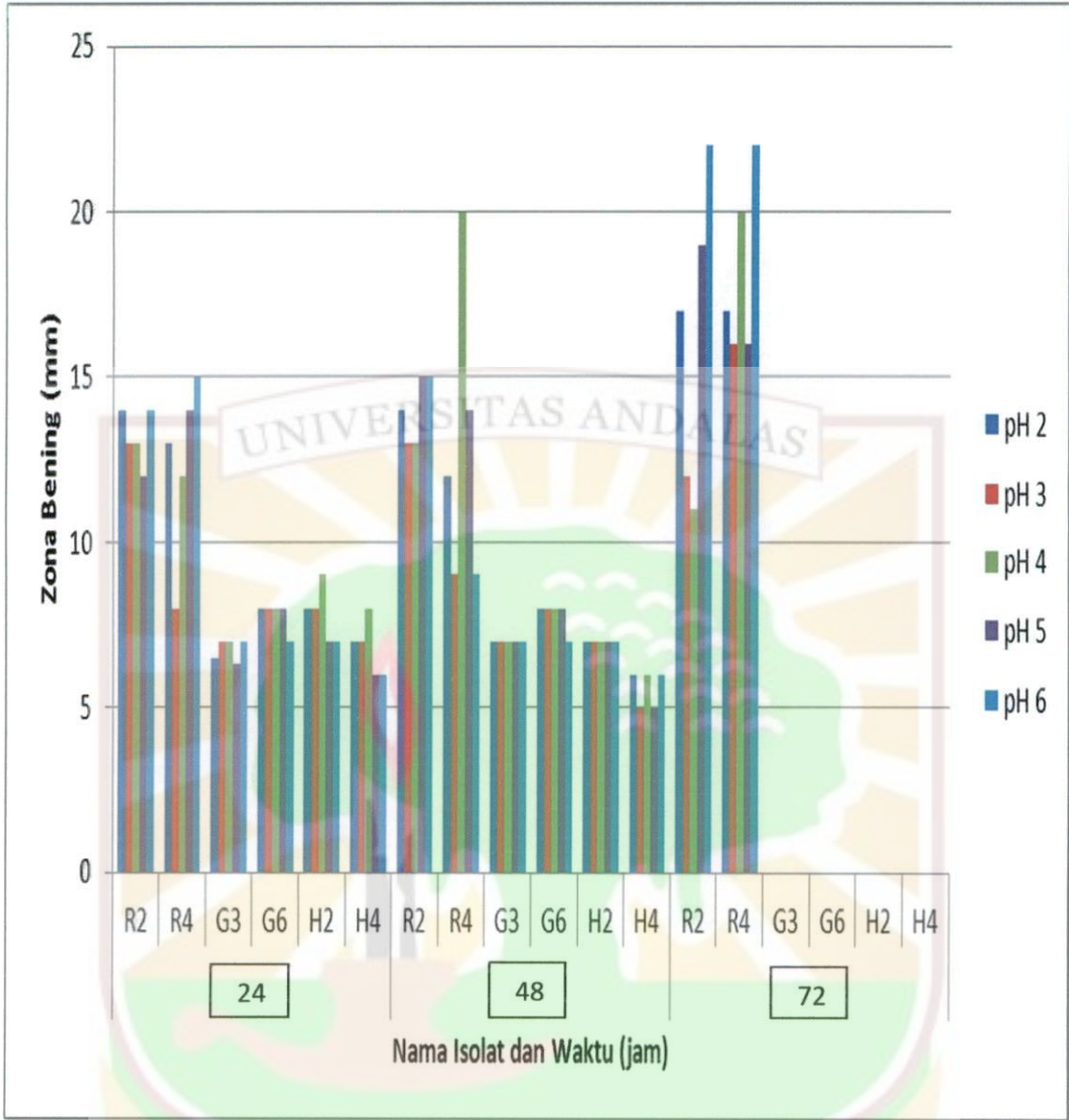
Isolat terpilih yang memberikan aktivitas antibakteri yang tertinggi ditumbuhkan ke dalam MRS Broth dengan range pH 2-6 yaitu R2, R4, G3, G6, H2 dan H4. Perlakuan ini bertujuan untuk mengoptimalkan pertumbuhan bakteri sehingga lebih efektif menghambat bakteri patogen yang dapat dilihat dengan semakin luasnya zona hambat yang dihasilkan. Sebagai bakteri uji digunakan bakteri patogen *E.coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*. Setelah waktu inkubasi selama 1x24 jam dapat diamati pertumbuhan bakteri dari kekeruhannya pada media MRS Broth.

Tabel 7. Hasil Pengamatan Kultur BAL Setelah Diinkubasi Selama 24 jam

Nama Isolat	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6
R2	keruh	bening coklat	bening coklat	keruh	sangat keruh
R4	agak keruh	bening coklat	bening coklat	keruh	sangat keruh
G3	keruh	bening coklat	keruh	keruh	sangat keruh
G6	keruh	bening coklat	agak keruh	keruh	sangat keruh
H2	bening coklat	bening coklat	agak keruh	keruh	keruh
H4	bening coklat	bening coklat	agak keruh	keruh	keruh

Dari tabel di atas dapat diamati bahwa semua isolat BAL sangat *survive* pada range pH 5-6 karena merupakan pH optimal untuk pertumbuhan BAL. Sedangkan pada pH 3 tidak ada satupun isolat BAL yang tumbuh karena pada kultur tidak tampak sedikitpun kekeruhan. Pada pH 2 tampak ada beberapa isolat yang keruh yaitu isolat R2, R4, G3 dan G6 yang artinya isolat tersebut dapat resisten terhadap suasana asam dan dapat dikategorikan sebagai bakteri probiotik.

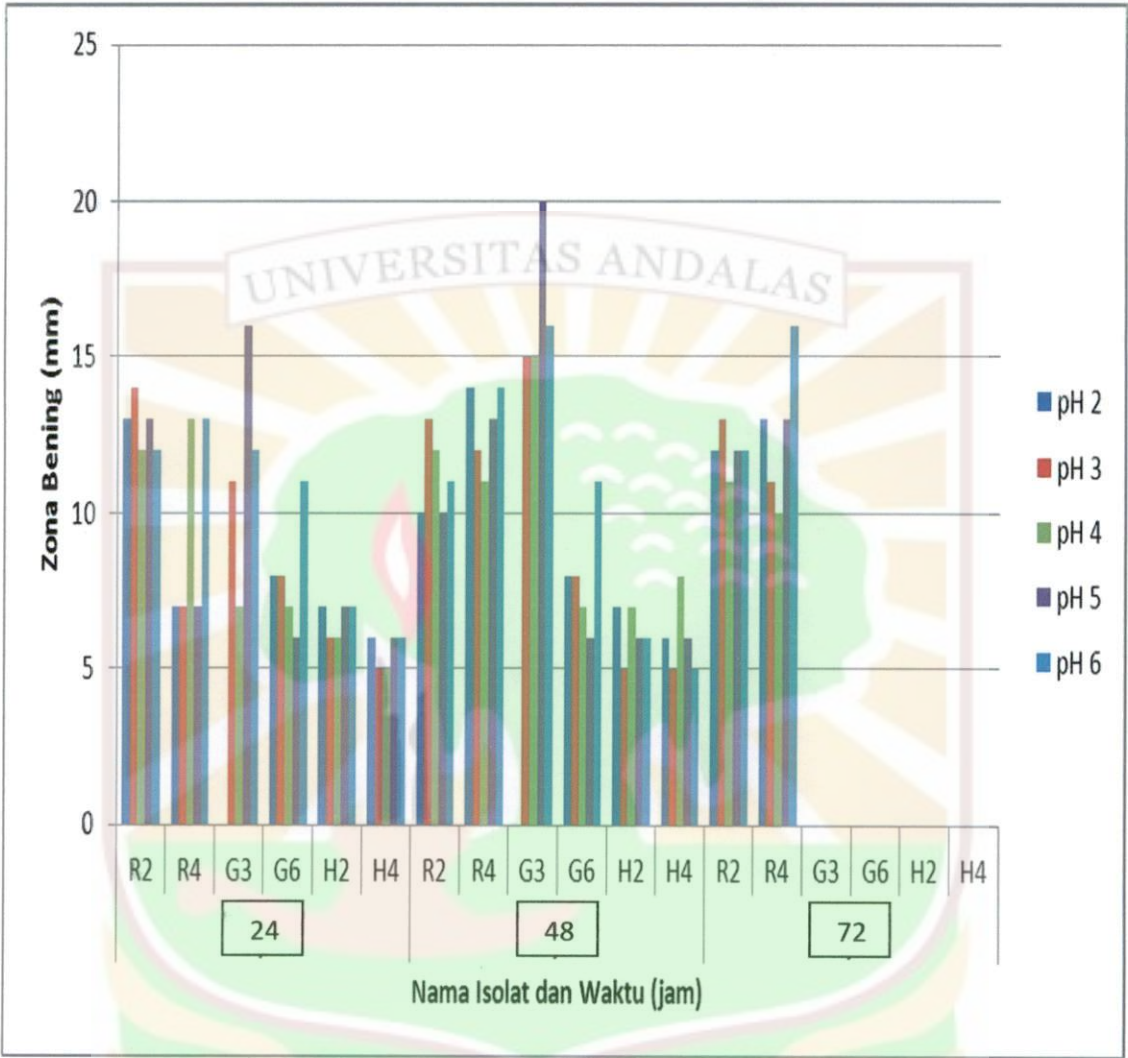
Selanjutnya isolat tersebut diuji daya tantangnya terhadap bakteri patogen *E.coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* dengan variasi waktu inkubasi 1x24 jam, 2x24 jam dan 3x24 jam. Tabel uji resistensi BAL terhadap asam dapat dilihat pada lampiran 16. Sedangkan grafik hasil pengamatan zona hambat dapat dilihat pada kurva di bawah ini:



Gambar 16. Grafik hasil pengamatan zona hambat isolat pada media dengan range pH 2-6 terhadap *E.coli*

Dari grafik di atas dapat dilihat bahwa isolat yang memiliki zona bening tertinggi adalah R2 dan R4 pada pH 6 dan dalam waktu inkubasi 3x24 jam. Hal tersebut menandakan bahwa range pH 5-6 merupakan pH optimal bagi pertumbuhan BAL untuk menantang bakteri patogen *E.coli*. Namun isolat yang memiliki zona bening tertinggi pada pH 2 adalah R2 dan R4. Hal ini menandakan bahwa isolat R2 dan R4 dapat *survive* dalam waktu inkubasi 3x24 jam dan dapat melawan bakteri patogen *E.coli* pada pH asam tersebut.

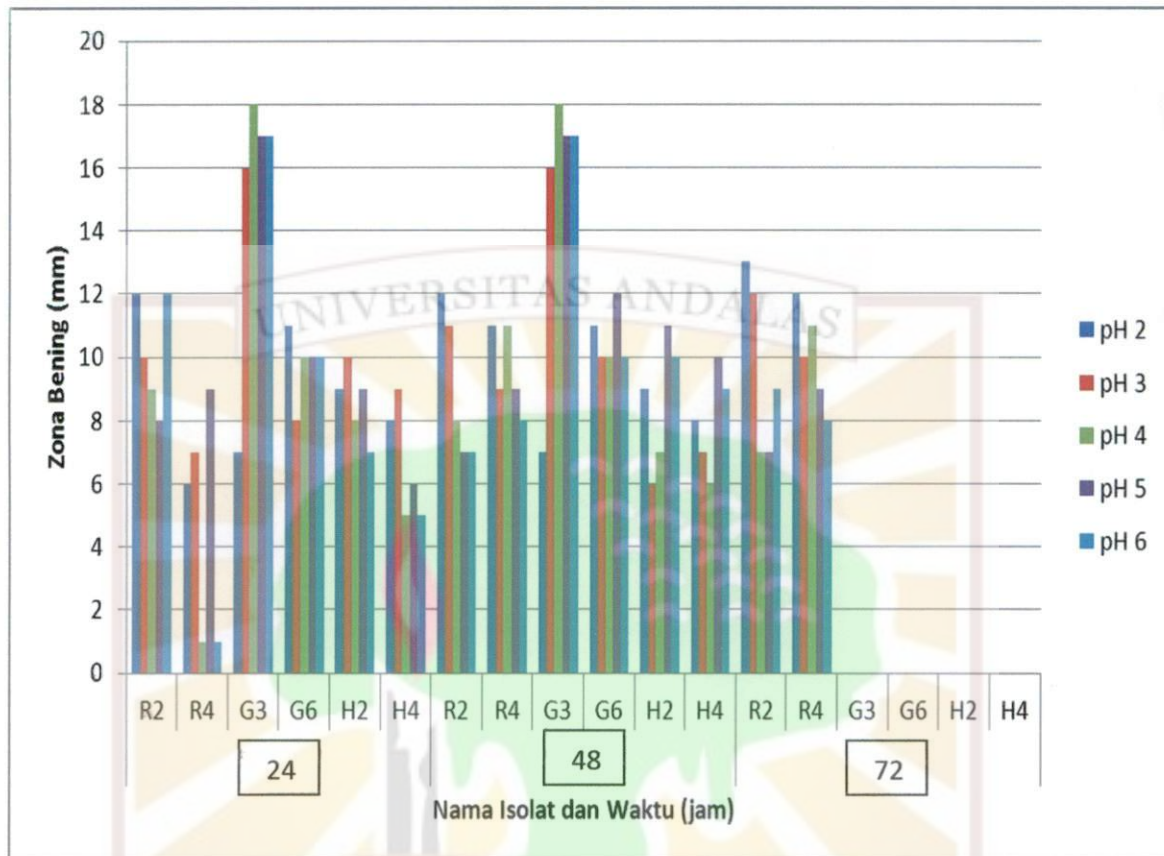
Selanjutnya uji resistensi bakteri terhadap media yang mengandung bakteri patogen *Streptococcus* pada pH asam adalah :



Gambar 1/. Grafik hasil pengamatan zona hambat isolat pada media dengan range pH 2-6 terhadap *Streptococcus*

Dari grafik di atas dapat dilihat bahwa isolat yang memiliki zona bening tertinggi adalah G3 pada pH 5 dan dalam waktu inkubasi 2x24 jam. Hal tersebut menandakan bahwa pH 5 merupakan pH optimal bagi pertumbuhan BAL untuk menantang bakteri patogen *Streptococcus*. Namun isolat yang memiliki zona bening tertinggi pada pH 2 adalah R4. Hal ini menandakan bahwa isolat R4 dapat survive dalam waktu inkubasi 2x24 jam dan dapat melawan bakteri patogen *Streptococcus* pada pH asam tersebut.

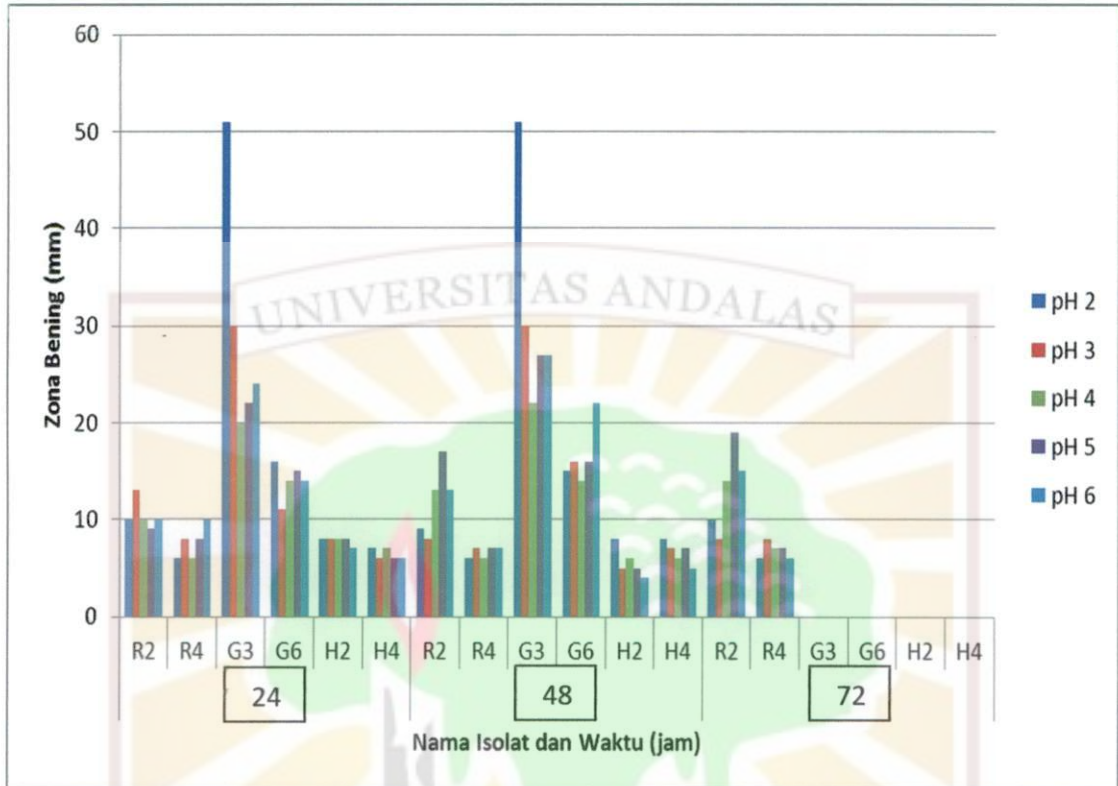
Selanjutnya uji resistensi bakteri terhadap media yang mengandung bakteri patogen *Staphylococcus* pada pH asam adalah :



Gambar 18. Grafik Hasil Pengamatan Zona Hambat isolat pada media dengan Range pH 2-6 terhadap *Staphylococcus*

Dari grafik di atas dapat dilihat bahwa isolat yang memiliki zona bening tertinggi adalah G3 pada pH 4 dan dalam waktu inkubasi 1x24 jam dan 2x24 jam. Pada umumnya pH 4 bukan merupakan pH optimal bagi pertumbuhan BAL namun jika dilihat pada tabel 7 dapat dilihat bahwa isolat G3 menunjukkan kekeruhan pada media pertumbuhannya. Dari hasil tersebut dapat dianggap bahwa isolat G3 dapat menantang bakteri patogen *Staphylococcus* pada pH 4. Namun isolat yang memiliki zona bening tertinggi pada pH 2 adalah R2. Hal ini menandakan bahwa isolat R2 dapat *survive* dalam waktu inkubasi 3x24 jam dan dapat melawan bakteri patogen *Staphylococcus* pada pH asam tersebut.

Selanjutnya uji resistensi bakteri terhadap media yang mengandung bakteri patogen *Pseudomonas* pada pH asam adalah:



Gambar 19. Grafik hasil pengamatan zona hambat isolat pada media dengan range pH 2-6 terhadap *Pseudomonas*

Dari gambar di atas dapat dilihat bahwa isolat G3 dapat *survive* pada pH 2 dalam waktu inkubasi 1x24 jam dan 2x24 jam dan dapat melawan bakteri patogen *Pseudomonas* pada pH asam tersebut.

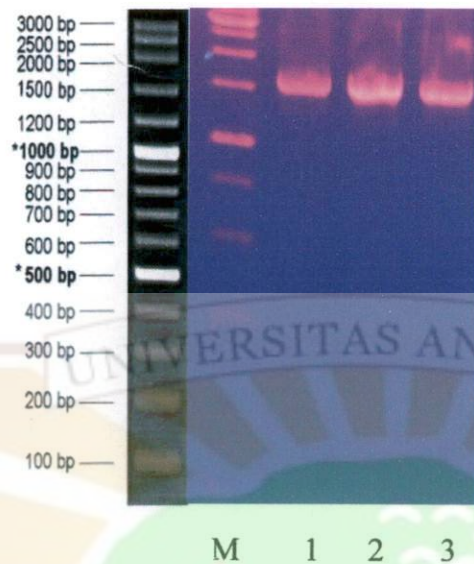
Dengan adanya fakta diatas maka dapat dilihat bahwa supernatan isolat R2 paling efektif dalam menghambat dua bakteri uji patogen *E.coli* dan *Staphylococcus* pada pH 2. Dengan demikian isolat R2 dapat digunakan sebagai biosuplemen probiotik sehingga dapat mengembalikan keseimbangan mikroflora dalam saluran pencernaan terutama pada usus sehingga nutrisi, vitamin, dan elemen penting lainnya bisa diserap secara sempurna dalam tubuh.

4.5 Isolasi DNA Genomik

Identifikasi isolat R2 sebagai isolat pilihan dilakukan berdasarkan pada sekuen 16S ribosomal RNA. Tahapan yang dilakukan adalah persiapan media, perbanyakkan bakteri, isolasi DNA, amplifikasi 16S rRNA dengan PCR, *sequencing* dan analisis hasil *sequencing*. Setelah diperoleh DNA genomik kemudian diamplifikasi 16S rRNA dengan PCR. Primer 16S rRNA adalah subunit ribosom yang dapat digunakan sebagai penanda, pembeda dan sebagai *evolutionary marker* pada bakteri.

Isolasi DNA total isolat bakteri R2 dilakukan dengan beberapa langkah penting (Brown, 1987) yaitu; kultur bakteri R2 ditumbuhkan (± 24 jam), kemudian sel bakteri dilisis untuk membebaskan isinya dengan SDS dan EDTA. Disamping DNA, ekstrak sel bakteri mengandung protein dan RNA dalam jumlah yang cukup besar. Langkah selanjutnya adalah menghilangkan ekstrak sel selain DNA dengan menambahkan campuran PC (Phenol:Chloroform) untuk menggumpalkan DNA. Pada saat ini larutan dalam *tube* akan membentuk 3 lapisan, DNA akan berada pada lapisan akuosa bagian atas dan protein akan terkoagulasi pada lapisan tengah. Lapisan DNA diambil dan selanjutnya ditambah dengan Na-asetat untuk membuat konsentrasi garam tinggi dan *single stranded* DNA tidak bisa larut pada keadaan tersebut. DNA kemudian diendapkan dengan penambahan isopropanol dingin. Setelah itu etanol dingin ditambahkan untuk mengeluarkan endapan garam Na^+ yang bermuatan positif dan DNA yang bermuatan negatif sehingga dapat menurunkan konstanta dielektrik. Proses terakhir adalah melarutkan DNA dengan TE untuk menjaga kestabilan pH dan menjaga struktur DNA yang diperoleh.

4.7 Amplifikasi Gen Pengkode 16S rRNA dengan PCR



Gambar 20 :

M (Marker) : 1 kb DNA
Ladder (Fermentas)

1. H2
2. R2
3. G3

Hasil isolasi genomik DNA kemudian diamplifikasi gen pengkode 16S rRNA nya dengan PCR sebanyak 30 siklus. Dielektroforesis selama 180 menit 100 Volt pada gel dengan konsentrasi 1%.

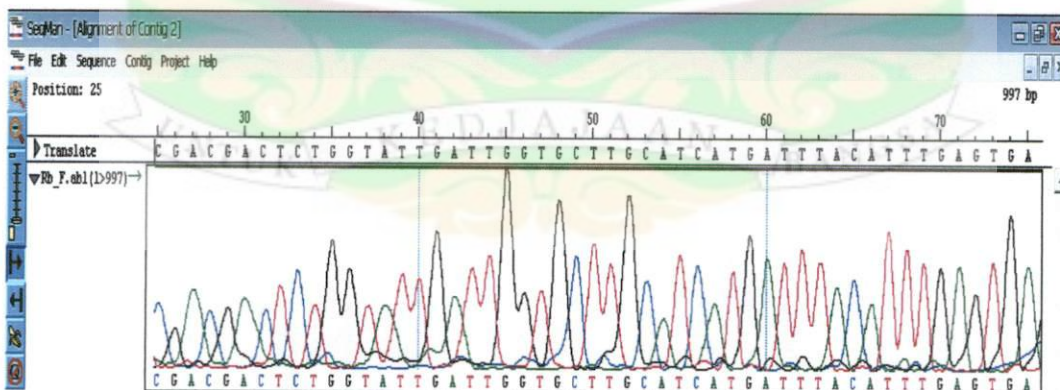
Hasil elektroforesis ini menunjukkan bahwa kegiatan PCR yang telah dilakukan berhasil mengamplifikasikan daerah gen 16S rRNA isolat R2, G3 dan H2. Sebenarnya isolat paling unggul yang diharapkan adalah R2 tetapi proses amplifikasi juga dilakukan terhadap isolat G3 dan H2 sebagai pembanding. Hal ini dapat dilihat oleh munculnya fragmen produk PCR dengan ukuran 1500 bp pada isolat R2, G3 dan H2 yang merupakan ukuran yang diharapkan jika menggunakan kombinasi primer AGAGTTTGATCCTGGCTAG untuk arah forward dengan primer AAGGAGGTGWTCCAGCC untuk arah reverse. Dari Gambar 20 dapat dilihat bahwa intensitas fragmen yang dihasilkan isolat R2 cukup tinggi, dan layak digunakan untuk kegiatan sekuensing pada tahap berikutnya.

4.8 Analisis Sekuen Gen 16S rRNA Isolat R2

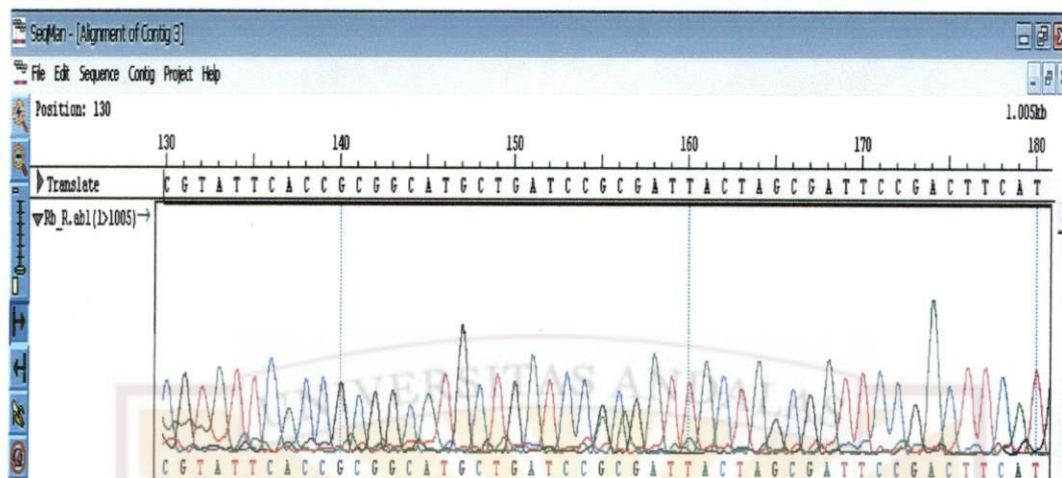
Proses sekuensing gen 16S rRNA yang diperoleh dari kegiatan amplifikasi dilakukan oleh Yayasan Genetika Lembaga Eijkman. Sekuensing dilakukan secara *two road direction* menggunakan primer yang sama dengan amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR. Dari hasil sekuensing hanya isolat R2 yang menunjukkan hasil yang bagus dan memuaskan, sementara isolat G3 dan H2 tidak dapat dianalisa lebih lanjut karena peak pada grafik electrophoregramnya tampak kusut dan tidak jelas. Hal ini mungkin disebabkan karena kurang murninya DNA yang telah diisolasi.

Hasil sekuensing berupa grafik electrophoregram dengan peak-peak yang berwarna-warni untuk membedakan jenis basa nitrogen (nukleotida) yang dicirikannya. Nukleotida A berwarna hijau, nukleotida G berwarna hitam, C nukleotida berwarna biru dan nukleotida T berwarna merah. Pola warna sekuen yang sama juga disampaikan oleh Ratnayani et al (2007).

Gambar hasil electrophoregram isolat R2 dengan primer forward dan reverse adalah:



Gambar 21. Hasil electrophoregram sekuen isolat R2 dengan primer forward setelah dilakukan pengeditan.



Gambar 22. Hasil elektrophoregram sekuen isolat R2 dengan primer reverse setelah dilakukan pengeditan

Hasil data sekuensing yang diperoleh dari kedua sampel diedit menggunakan software khusus dan dikontrol secara manual. Berdasarkan Gambar 21 dan 22 dapat dilihat bahwa kedua peak yang dihasilkan cukup baik sehingga lambang N yang merupakan lambang untuk simbol A, G, C, dan T yang muncul tidak banyak. Kontrol lambang nukleotid dilakukan dengan memperhatikan pola puncak-puncak tertinggi dari puncak lainnya. Jika terjadi keraguan maka penentuan jenis nukleotidnya difokuskan dengan memperkecil terjadinya variasi dari runutan nukleotid dengan sampel yang lain.

Gambar 21 di atas merupakan hasil sekuensing dari arah primer forward dengan panjang 682 bp dengan runutan sekuen dapat dilihat pada Lampiran 17, sedangkan Gambar 22 merupakan hasil sekuensing dari arah reverse dengan panjang 775 bp dengan runutan sekuen dapat dilihat pada Lampiran 17. Dengan demikian total nukleotid gen 16S rRNA yang berhasil tersekuen 1457 bp.

4.9 Analisis BLAST Sekuen DNA R2

Analisis BLAST dilakukan dengan tujuan untuk membandingkan da
sekuen yang dimiliki dengan sekuen-sekuen DNA dari berbagi penjuru dunia dan
bakteri yang didepositkan pada database atau gen bank sekuen publik. Analisis
BLAST dilakukan secara on line pada website NCBI
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Panjang sekuen utuh isolat R2 yang dibandingkan
dengan sekuen database pada BLAST adalah 1457bp. Hasil analisis BLAST dari
isolat R2 dapat dilihat pada gambar berikut:

Sequences producing significant alignments:

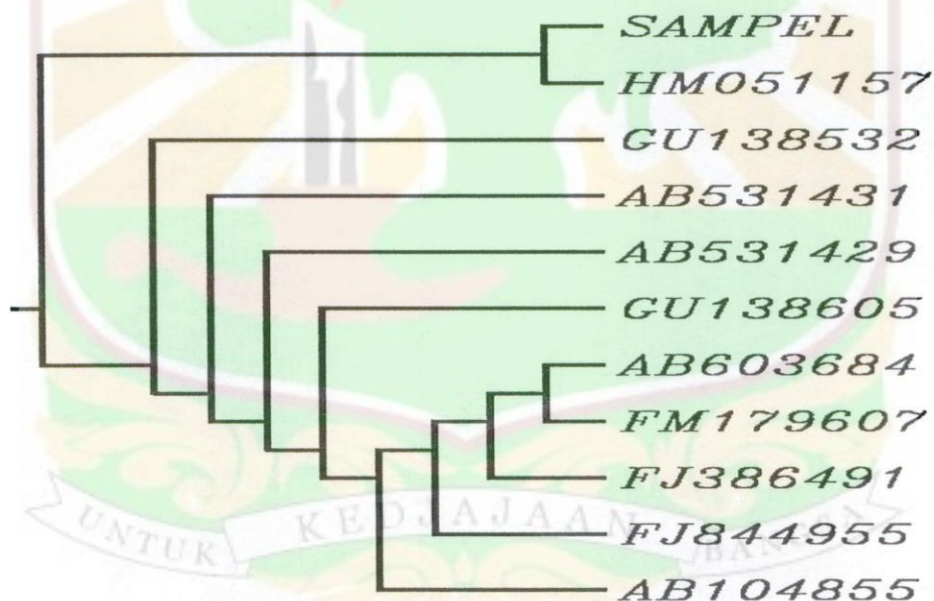
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AB603684.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene for 16S rRNA, partial s	2656	2656	99%	0.0	99%
AB603680.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene for 16S rRNA, partial s	2656	2656	99%	0.0	99%
AB603678.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene for 16S rRNA, partial s	2656	2656	99%	0.0	99%
AB603677.1	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene for 16S rRNA, partial s	2656	2656	99%	0.0	99%
HM218143.1	Lactobacillus plantarum strain NM28-2 16S ribosomal RNA gene, parti	2656	2656	99%	0.0	99%
HM051157.1	Lactobacillus sp. T23/3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2656	2656	99%	0.0	99%
GU138606.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10278 16S ribosomal RNA gene, partial	2656	2656	99%	0.0	99%
GU138605.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10277 16S ribosomal RNA gene, partial	2656	2656	99%	0.0	99%
GU138604.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10276 16S ribosomal RNA gene, partial	2656	2656	99%	0.0	99%
GU138601.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10273 16S ribosomal RNA gene, partial	2656	2656	99%	0.0	99%
GU138586.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10258 16S ribosomal RNA gene, partial	2656	2656	99%	0.0	99%
GU138551.1	Lactobacillus plantarum IMAU:10223 16S ribosomal RNA gene, partial	2656	2656	99%	0.0	99%
GU138532.1	Lactobacillus helveticus IMAU:10204 16S ribosomal RNA gene, partial	2656	2656	99%	0.0	99%
GU125608.1	Lactobacillus plantarum strain IMAU80188 16S ribosomal RNA gene, p	2656	2656	99%	0.0	99%
GU125606.1	Lactobacillus plantarum strain IMAU80186 16S ribosomal RNA gene, p	2656	2656	99%	0.0	99%
GU125605.1	Lactobacillus plantarum strain IMAU80185 16S ribosomal RNA gene, p	2656	2656	99%	0.0	99%
GU125604.1	Lactobacillus plantarum strain IMAU80184 16S ribosomal RNA gene, p	2656	2656	99%	0.0	99%
GU125594.1	Lactobacillus plantarum strain IMAU80174 16S ribosomal RNA gene, p	2656	2656	99%	0.0	99%
GU125572.1	Lactobacillus plantarum strain IMAU80150 16S ribosomal RNA gene, p	2656	2656	99%	0.0	99%
GU125571.1	Lactobacillus plantarum strain IMAU80149 16S ribosomal RNA gene, p	2656	2656	99%	0.0	99%

Gambar 23. Hasil Analisis BLAST dari Isolat R2 BAL

Berdasarkan Gambar di atas dapat dilihat bahwa isolat R2 memiliki persentase kesamaan sebesar 99% dengan *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sp T23/3*, *Lactobacillus helveticus* karena mempunyai persentase tingkat kesamaan yang tertinggi dengan database genbank NCBI.

Analisis kekerabatan strain *Lactobacillus plantarum* dan beberapa strain *Lactobacillus sp T23/3* dan *Lactobacillus helveticus* yang ada di databank BLAST dilakukan dengan CLUSTALW secara on line.

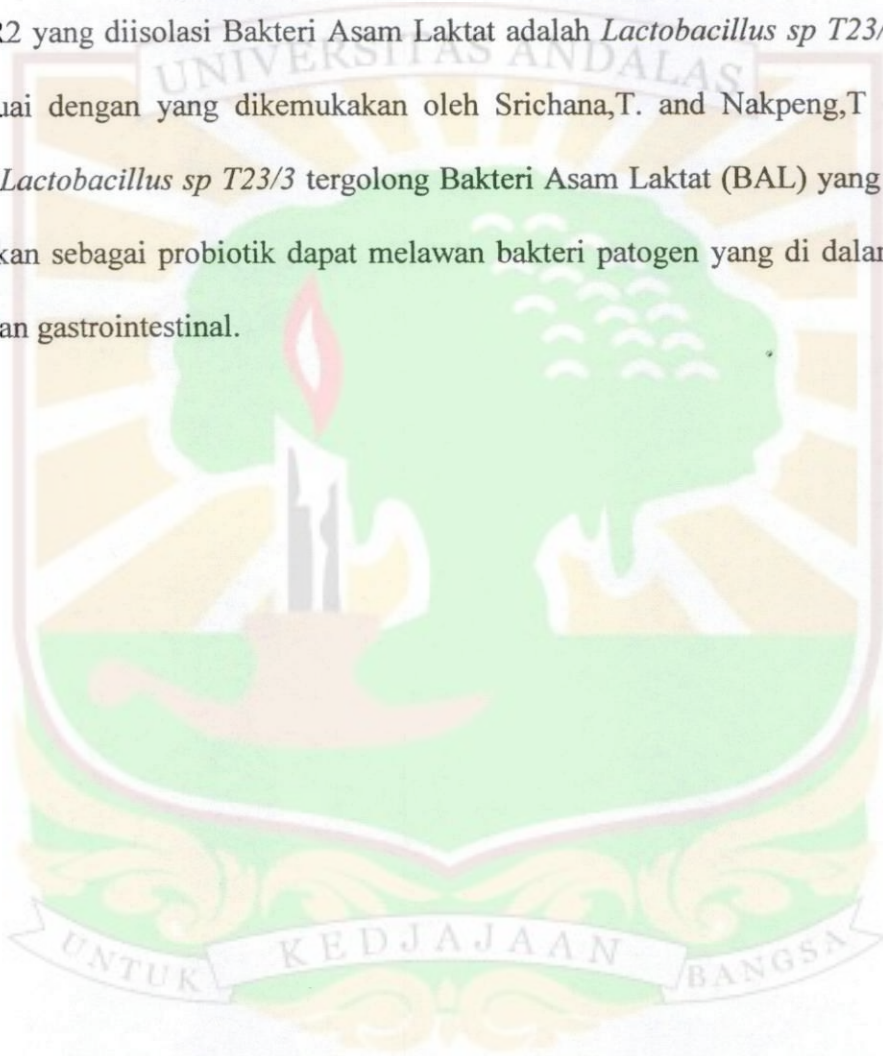
Hasil analisis CLUSTALW disajikan dalam bentuk pohon pilogenetik yang dapat dilihat pada Gambar berikut:



Gambar 24. Pohon Pilogenetik isolat 13B *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sp T23/3* dan *Lactobacillus helveticus* yang ada di databank BLAST.

Berdasarkan Gambar di atas dapat dilihat bahwa terdapat dua kelompok besar bakteri. Satu cabang ada dua bakteri sedangkan cabang yang lain ada 9 bakteri. Ternyata Isolat R2 mempunyai kekerabatan yang dekat dengan kelompok *Lactobacillus sp T23/3*.

Dari hasil keseluruhan identifikasi analisis BLAST menunjukkan bahwa isolat R2 yang diisolasi Bakteri Asam Laktat adalah *Lactobacillus sp T23/3*. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Srichana,T. and Nakpeng,T (2010) bahwa *Lactobacillus sp T23/3* tergolong Bakteri Asam Laktat (BAL) yang ketika digunakan sebagai probiotik dapat melawan bakteri patogen yang di dalam usus halus dan gastrointestinal.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Isolat Bakteri Asam Laktat R2 (*Criollo*) mempunyai kemampuan menghasilkan enzim ekstraseluler amilase tertinggi dengan indeks zona bening 3,6.
2. Isolat Bakteri Asam Laktat R2 (*Criollo*) memiliki aktivitas enzim sebesar 1,480 U/mL dan aktivitas spesifik enzim sebesar 2,047 U/mg.
3. Isolat Bakteri Asam Laktat Amilolitik R2 (*Criollo*) dapat digunakan sebagai probiotik karena dapat melawan bakteri patogen dan juga resisten terhadap suasana asam.
4. Isolat Bakteri Asam Laktat Amilolitik adalah jenis isolat baru yang mempunyai kemiripan 99% dengan *Lactobacillus sp T23/3*.

5.2 Saran

Untuk penelitian selanjutnya, agar memperoleh sekuen DNA Genomik total isolat R2 dilakukan desain primer dan dilakukan metoda *primer walking* untuk mengidentifikasi lebih lanjut. Dan juga dapat optimalisasi isolat R2 untuk menghasilkan enzim ekstraseluler lebih tinggi dengan cara pemurnian enzim yaitu bisa dengan *dialysis*, kromatografi penukar ion atau dengan ultra filtrasi sehingga aktivitas enzim spesifik dari produk yang dihasilkan dapat ditingkatkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ardhana, Made M. 2002. *The Microbial Ecology of cacao bean Fermentation in Indonesia*. International Journal of Food Microbiology 86 (2003) 87 – 99.
- Ardiyansya, Heru, SP, 2009. *Jenis-Jenis Kakao Yang Tumbuh di Indonesia*. Blogger Indonesia. www.kakaoindonesia.blogspot.com.
- Biogen, 2008. *Amilase*. http://biogen.litbang.deptan.go.id/terbitan/agrobio/abstrak/agrobio_vol. tanggal akses 05 Mei 2008.
- Brock, T.D., 1978. *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures* Springer-Verlag, New York.
- Cai. Hugh, Archambault. Marie, Prescott. J, 2003, *16S rRNA Sequence Based Identification of Veterinary Clinical Bacteria*. Journal Vet Diagnostic Investigation. 15: 465-469.
- Collington G.K., D.S. Parker and D.G. Armstrong. 1990. *The influence of inclusion of either and antibiotic or a probiotic in the diet on the development of digestive enzyme activity in the pig*. Brit. J. Nutr. 64: 59-70
- Fox, GE., Wisotzkey, J. D, 1992. *How Close is close: 16S rRNA Sequence identity may not be sufficient to guarantee species Identity*. Int. J. Syst. Bacteriol 42, 166-170
- Galvez S.L., Loiseau G, Paredes J.L, Barel M, Guiraud J.P., 2006. *Study on microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic*. Int. Journal of Food Micro-biol 114 92007) 124-130
- Giraud E, Champailier A, Raimbault M, 1994. *Degradation of Raw Starch by a Wild Amylolytic Strain of Lactobacillus plantarum*. Appl. and Environmental Microbiology, p. 4319-4323
- Jamsari. 2007. *Bioteknologi Pemula .Prinsip Dasar dan Aplikasi Analisis Molekuler*. UNRI Press. Pekanbaru. Hal: 74-76.
- Kandler, O and Weiss, N. (1986). *Regular, non sporing gram-Positive rods, in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2 (P.H.A. sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, dan J.G. Holts, eds). Williams dan Wilkins, Baltimore, pp. 1208-1234.
- Lukito, A.M. 2004. *Panduan Lengkap Budi Daya Kakao Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia*. PT. Agromedia Pustaka.

- Maier, R.M., Pepper, I.L., & Gerba, C.P., 2000. *Environmental Microbiology*. Academic Press. London.
- Mustopa, Apon. 2009. *Koleksi Protokol Laboratorium Virologi Molekuler*. Pusat Penelitian Bioteknologi. LIPI. Bogor.
- Naidu A.S., W.R. Bidlack and R.A. Clemens. 1999. *Probiotic spectra of lactic acid bacteria*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 39: 13-126
- Nettles, CE, Barefoot SF 1993. *Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria*, J. Food Pro. 56, 338-356.
- Nguyen T.T.T., G. Loiseau, C. Icard-Verniere, I. Rychette, S. Treche and J.P. Guyot. 2007. *Effects of fermentation by amylolytic lactic acid bacteria, in process combinations, on characteristics of rice/soyabean slurries; a new method for preparing high energy density complementary foods for young children*. Food Chem. 100: 623-631
- Nowroozi J., M. Mirazaii and Norouzii. 2004. *Study of Lactobacillus as probiotic bacteria*. Iranian J. Pub. Health 33: 1-7
- Oktarya, Zona. 2010. *Isolasi dan Karakterisasi Enzim Selulase dan Amilase Serta Identifikasi Gen 16s rRna Bakteri Termofilik dari Sumber Air Panas Bukit Kili Ketek Solok*. Jurusan Bioteknologi. Program Pascasarjana Universitas Andalas.
- Palmer, T. 1985. *Understanding Enzyme*. Ellishorwood Publisher
- Panda S.H., and R.C. Ray. 2007. *Anthocyanin rich sweet potato lacto-juice: production and nutritional composition*. Int. j. Food Microbiol. 42: doi; 10.1111/j.1365-2621.2007.0692.x
- Panda S.H., M. Parmanick and R.C. Ray. 2007. *Lactic acid fermentation of sweet potato (Ipomoea batatas L.) into pickles*. J. Food Process. Preserv. 31: 83-101.
- Poedjiadi, A. & Supriyanti, T., 2007. *Dasar-Dasar Biokimia*. Universitas Indonesia. Jakarta
- Pompeyo C.C., M.S. Gomez, S. Gasparian and J. Morlon Guyot. 1993. *Comparison of amylolytic properties of Lactobacillus amylovorus and of Lactobacillus amylophilus*. Appl. Micro-biol. Biothecnol. 40: 266-269
- Purwati, Endang. S. Radu. *Antimicrobial Drug Resistance and Resistance Factor Transfer Among Listeria Species*. Journal of Asian Fisheries Science 11: 261-270. 1998.

- Ray R.C. and S.H Panda. 2007. *Lactic acid fermentation of fruits and vegetables an overview*.pp. 155-188. In: palino M.V (ed). Food Microbiology Research Trends, Nova Science Publishes Inc., Hauppauge, New York.
- Rincker M.J., S.D. Carter and s.E.Gilliand. 2000. *Potential of amylolytic cultures of lactobacillus acidophilus to improve dietary starch utilization in weanling pigs*. Anim. Sci. Res. Rep. pp. 142-146
- Salminen, S. & von Wright, A.1998. *Lactic acid bacteria*. Marcel Dekker. New York.
- Sharpe, M.E. (1981). *The Gennus Lactobacillus In The Procaryotes : A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria* (M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, and H.G. Schlegel, eds). Springer-Verlag, Berlin, pp.1653-1674.
- Spillane.J.1995.,*Komoditi Kakao, Peranannya dalam Perekonomian Indonesia*. Kanisius. Yogyakarta
- Stanbury, P.F and A. Whitaker. 1984.*Principles of Fermentation Technology*. Pergamon Pers. Oxford
- Steinkraus K.H. 2002.*Fermentation in world food processing*. Comp. Rev. Food Sci. Safety 1:23-31.
- Surono, I.S. 2004. *Probiotik: Susu Fermentasi dan Kesehatan*. PT. Tri Cipta Karya. Jakarta.
- Syukur, S. Purwati, Endang. Husmaini. Y. Murni, F. Othman, *Lactobacillus sp. Isolasi dari Blondo Virgin Coconut Oil Efektif sebagai Probiotik, pada Prosiding Badan Kerja Sama Universitas Wilayah 3*. Jambi, 26-28 April 2006.
- Syukur, S. Purwati, Endang. *Peranan Pangan Probiotik untuk Mikroba Patogen dan Kesehatan*. Dharma wanita Persatuan Propinsi Sumatera Barat. Padang. 8 Agustus 2006.
- Turner, Gashaw and Eva, 2007.*Potetial and Utilization of Thermophile and Termostable Enzymes in Biorefining*.Microbial Cell Factories. BioMed Central.
- Vishnu c., B.J. Naveena, Md. Altaf, M. Venkanteswar and G.Reddy. 2006. *Amylopullunase-a novel enzyme of Lactobacullusamylophilus GV 6 in direct fermentation of starch to L (+) lactic acid*. Enz.Microb. Technol. 38:545-550
- Winarno,H.,1986.*Daya dan Mutu Hasil Hibrida Antar klon Kakao dan Kaitannya dengan Penanganan Kebun Benih*”, Pelita Perkebunan

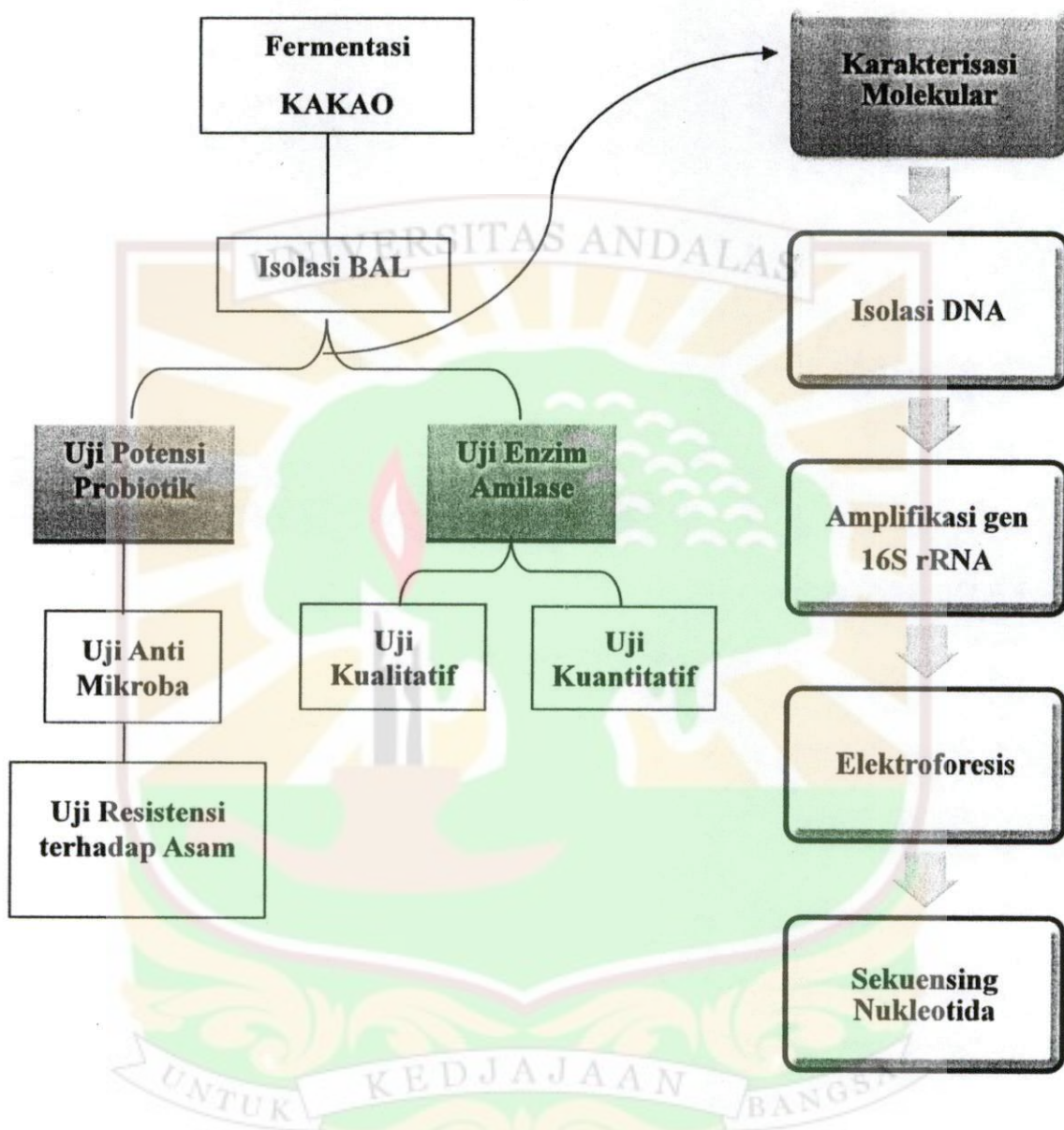
Woese, Carl E, 1987. *Bacterial Evolution in Microbiological*. 52(2): 222-229.

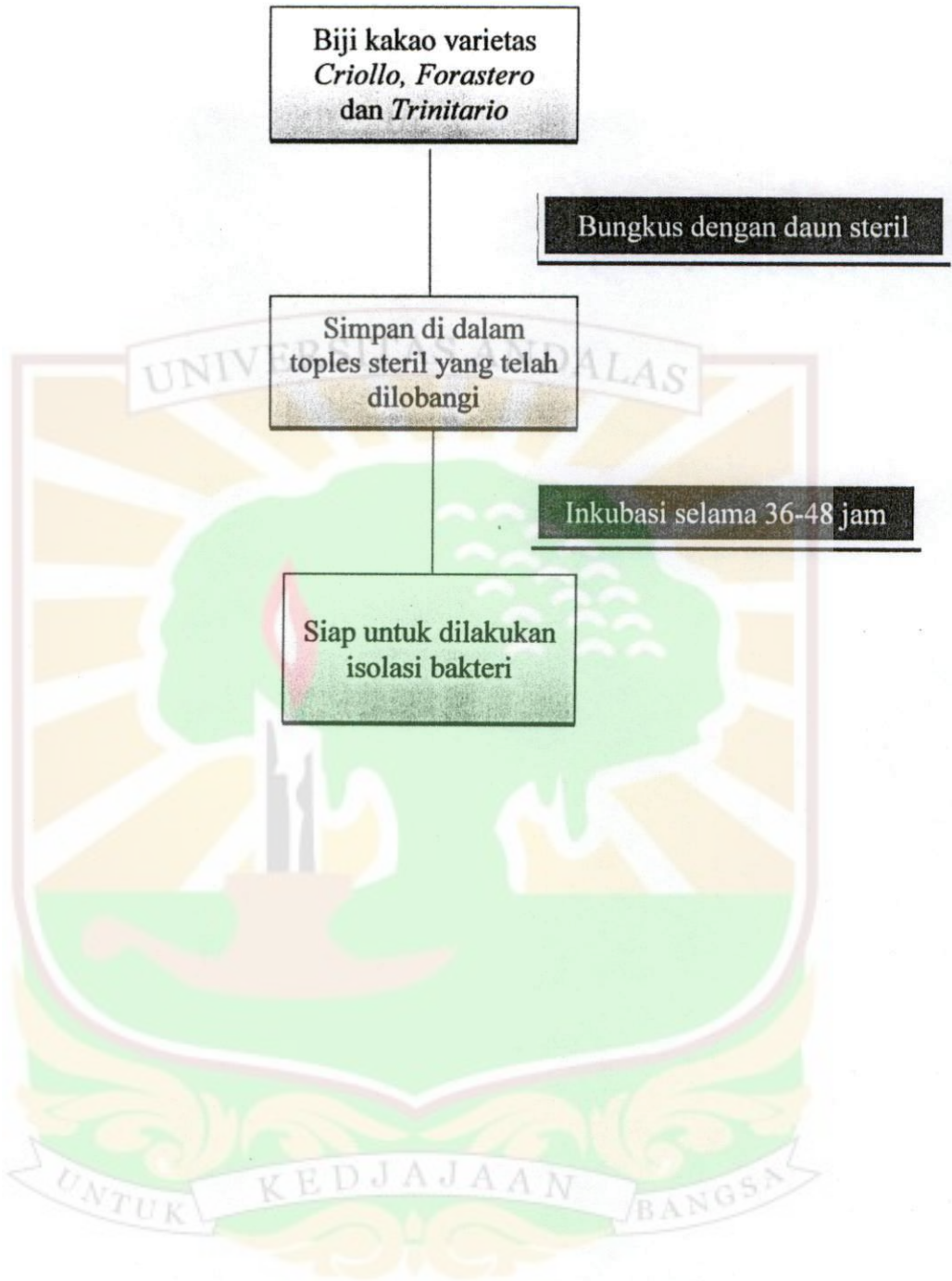
Woolford, M.K., 1984. *The silage fermentation*, pp 304-306. Marcel Dekker, Inc., New York.

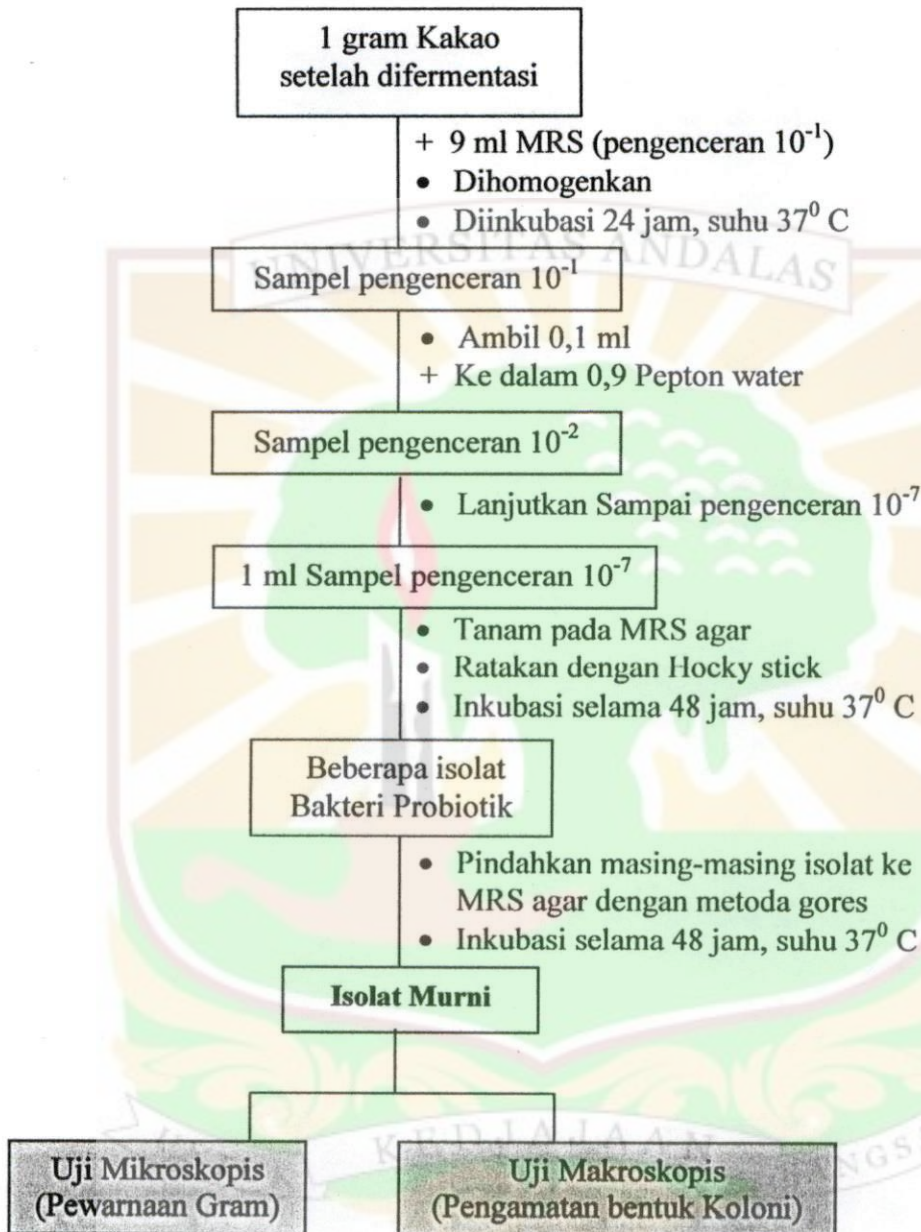
www.sumbar.litbang.deptan.go.id

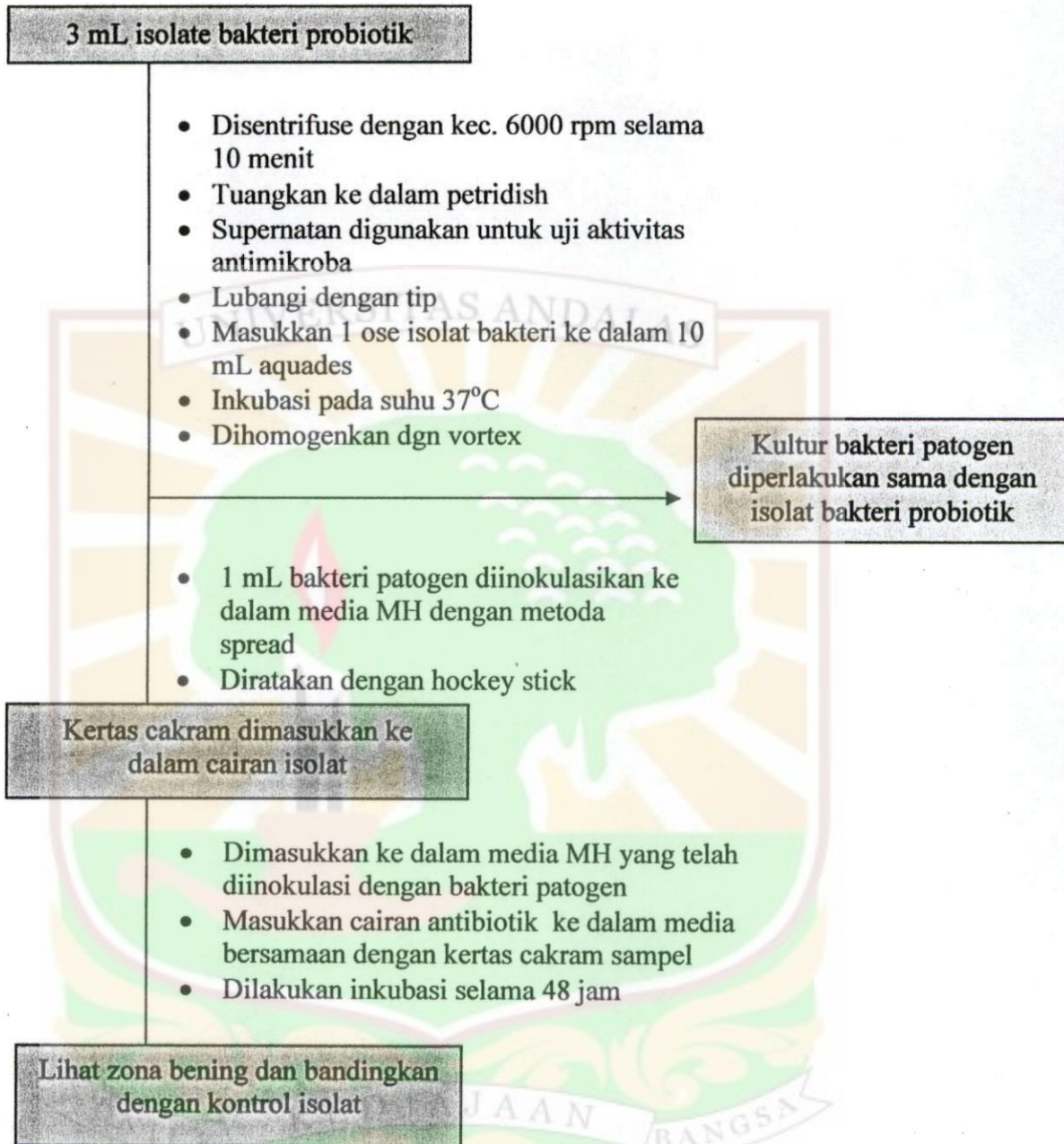


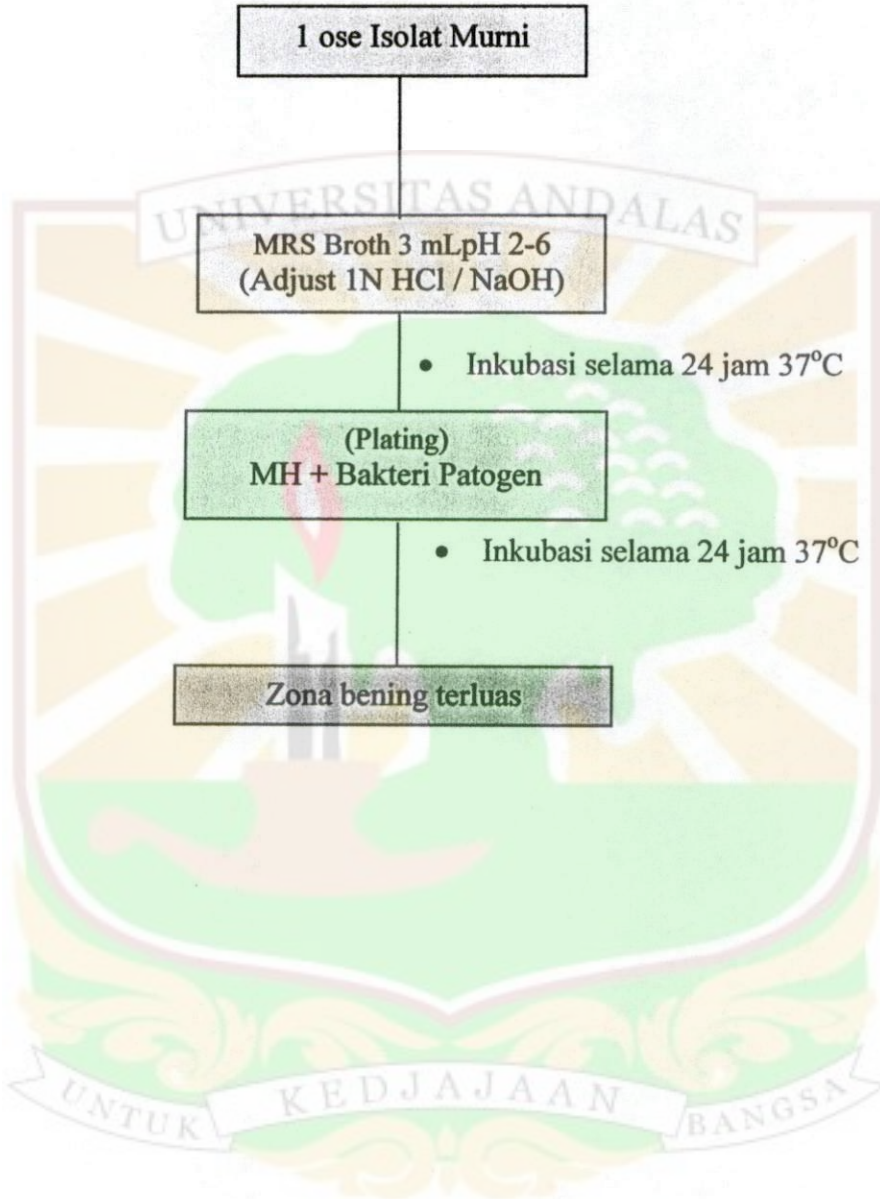
Lampiran 1. SKEMA KERJA

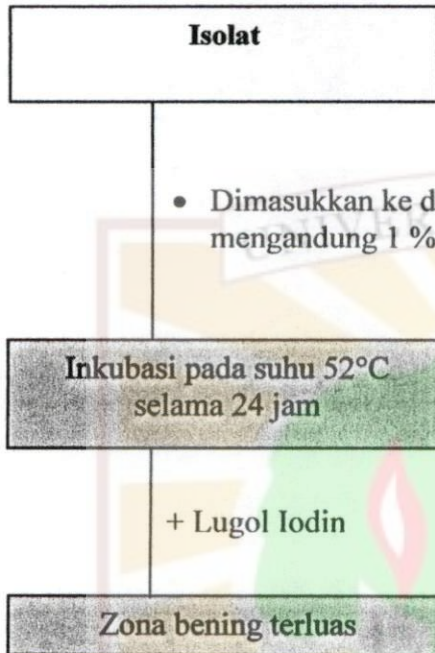


Lampiran 2. Fermentasi KAKAO

Lampiran 3. Isolasi Bakteri Probiotik dari Fermentasi Kakao

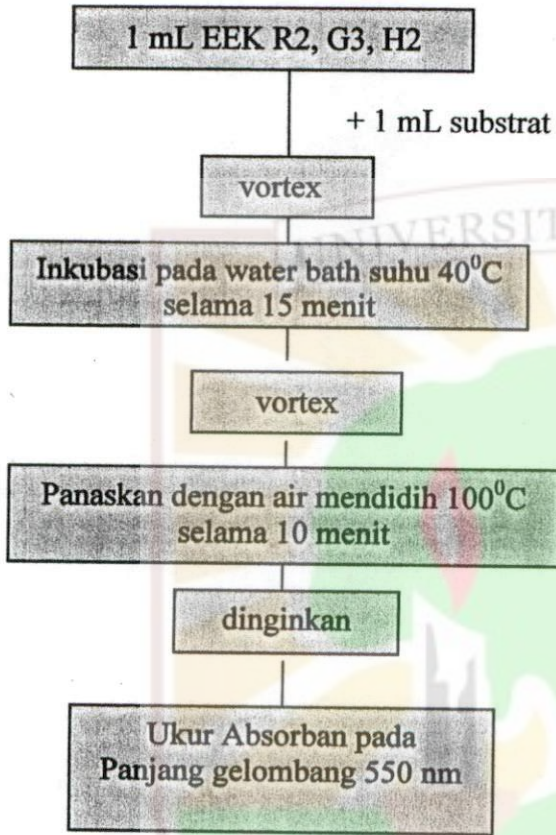
Lampiran 4. Uji Aktivitas Antimikroba

Lampiran 5. Uji resistensi Bakteri Probiotik terhadap Asam

Lampiran 6. Uji Kualitatif Amilase

Lampiran 7. Uji Kuantitatif Amilase

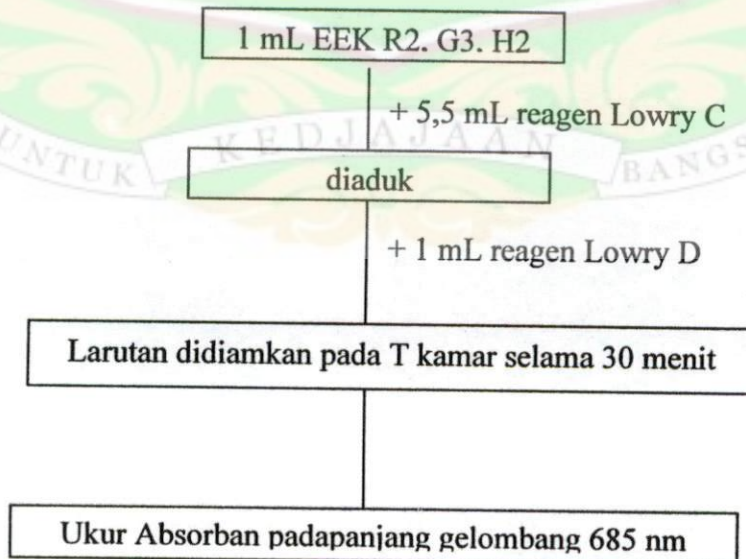
Pengukuran Sampel



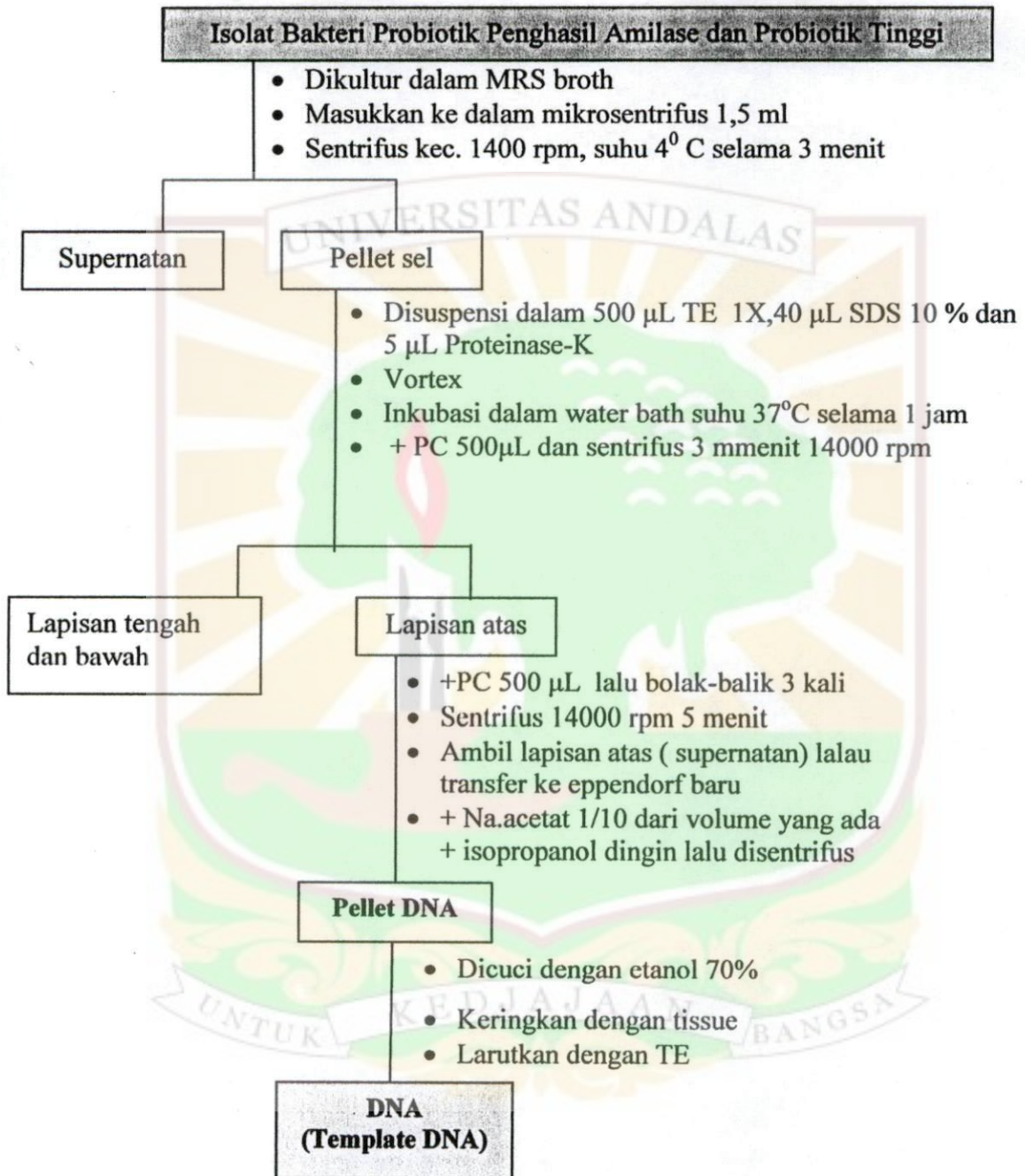
Pengukuran Blanko

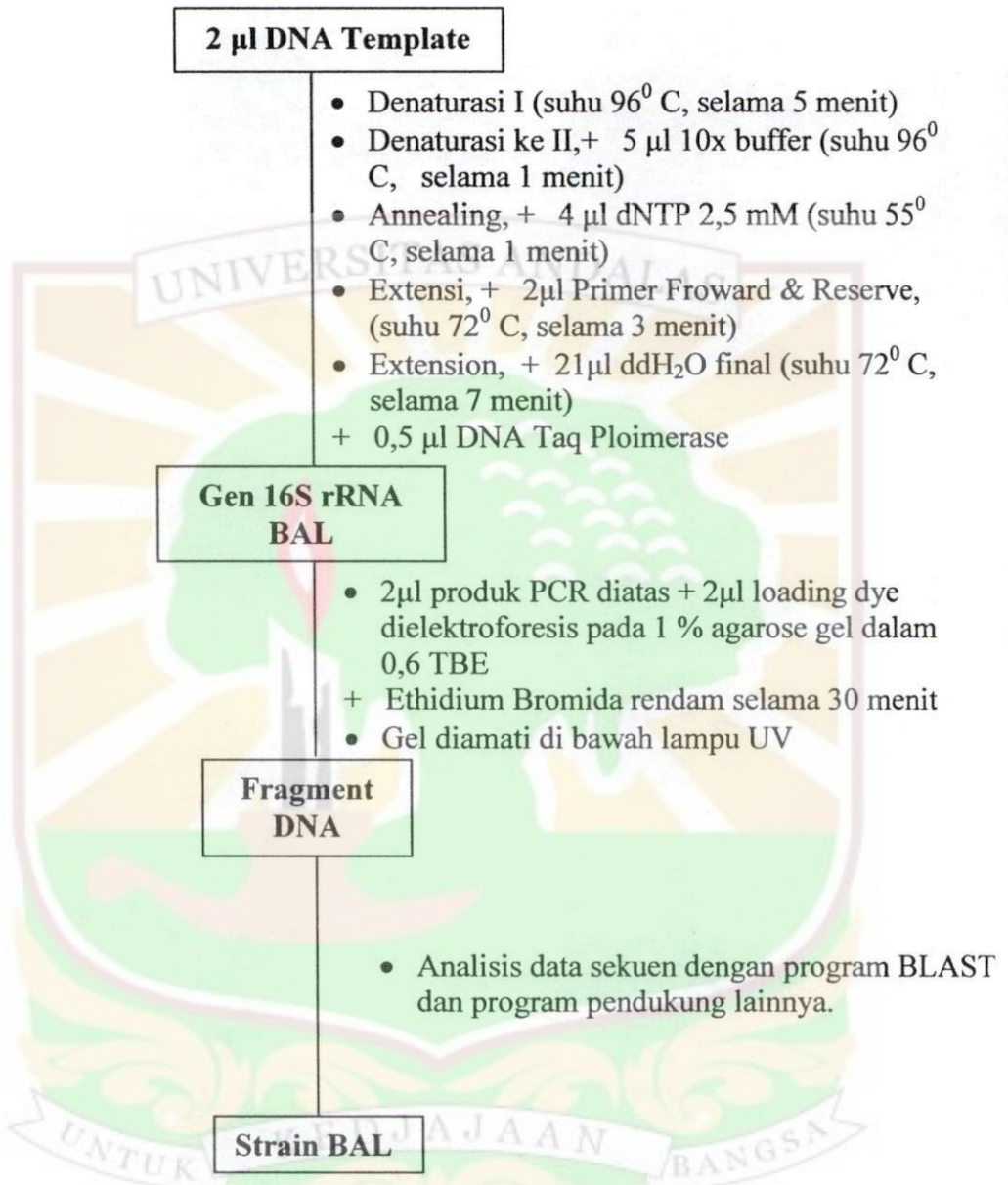


Penentuan Kadar Protein sampel

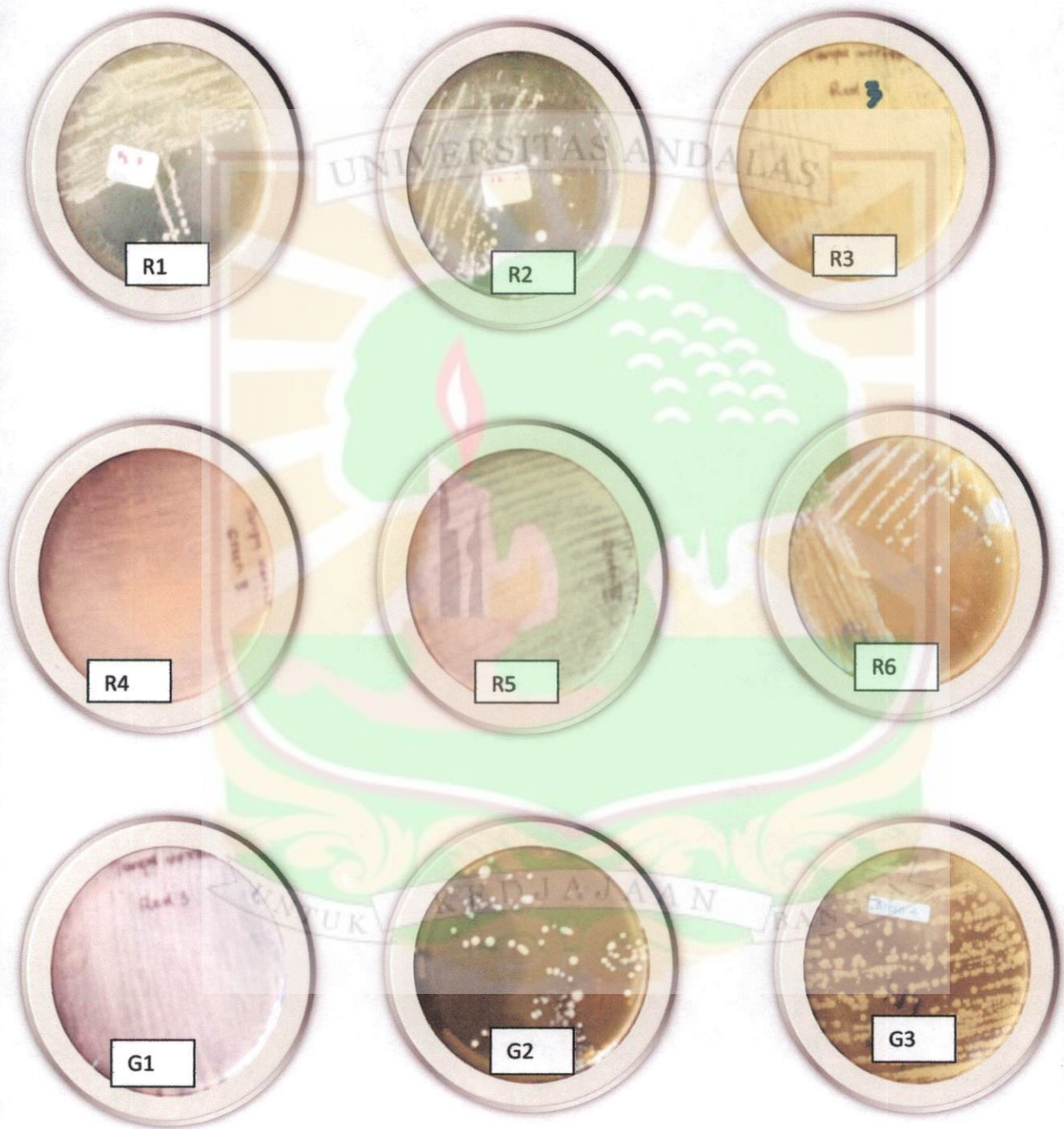


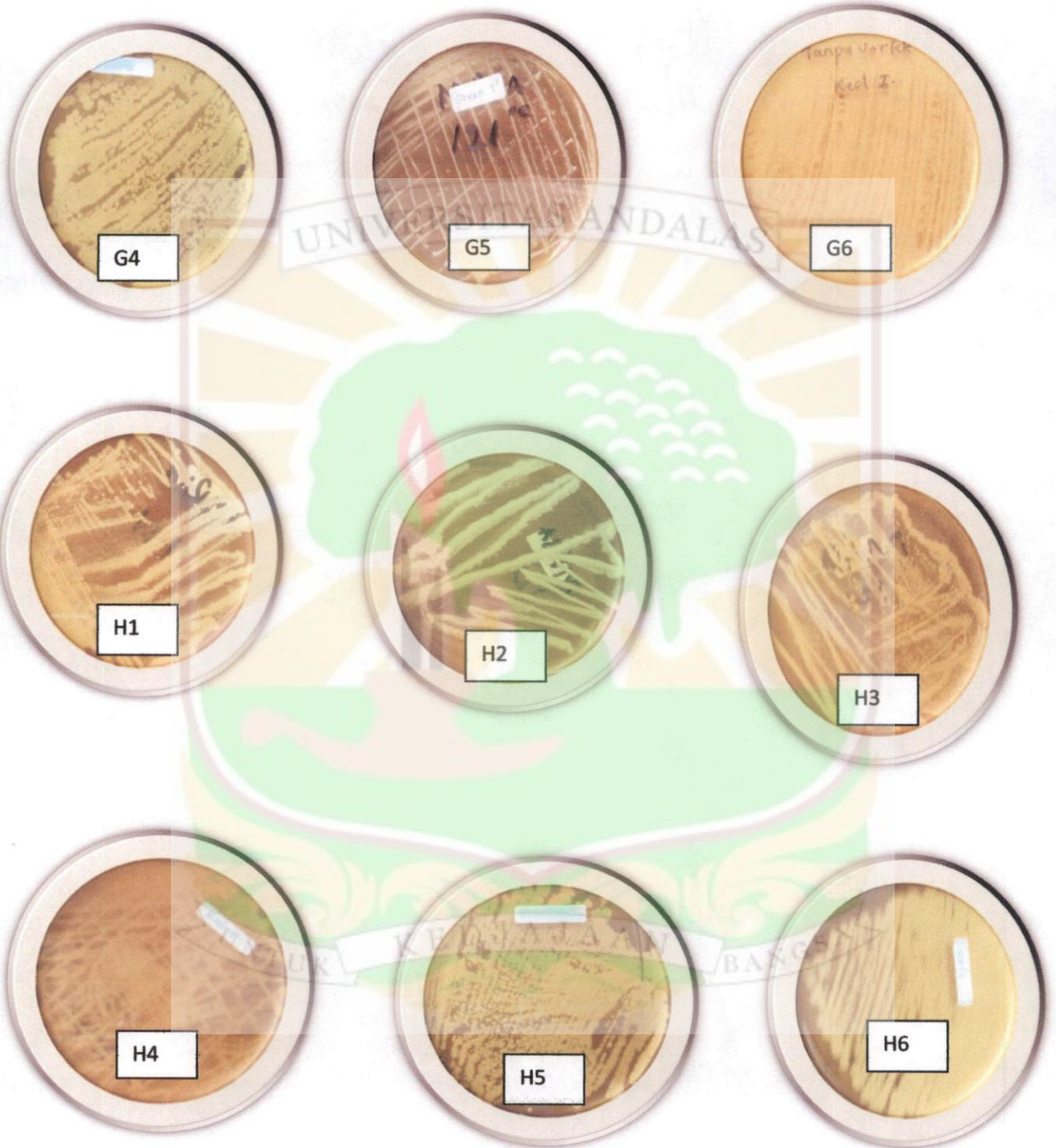
Lampiran 8. Isolasi DNA



Lampiran 9. Amplifikasi Gen 16S rRNA dengan PCR

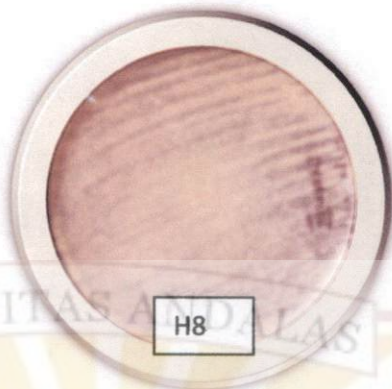
Lampiran 10. Gambar 20 isolat BAL







H7



H8



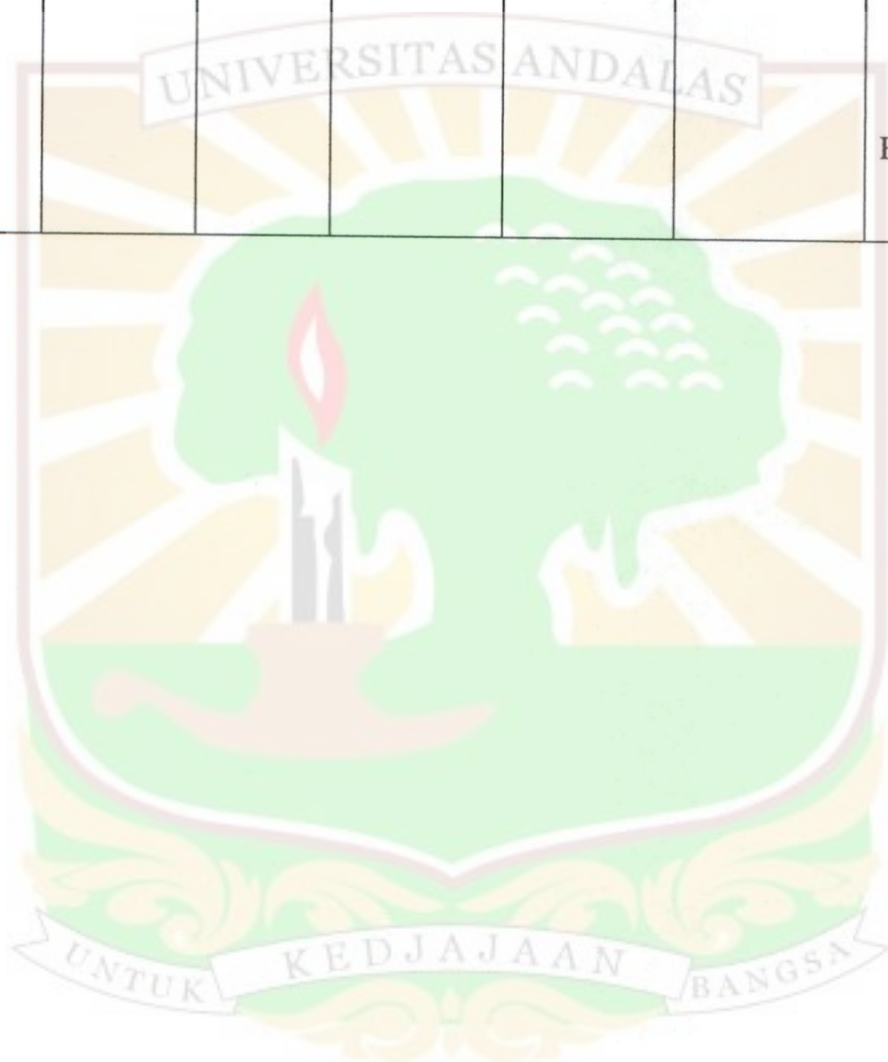
Lobate



Begerigi tajam



Filamen



Lampiran 12. Hasil Uji Kualitatif Enzim Amilase

Sampel	Diameter Bakteri (cm)	Inkubasi 1x24 jam		Inkubasi 2x24 jam		Inkubasi 3x24 jam	
		Diameter zona bening (cm)	Indeks zona bening	Diameter zona bening (cm)	Indeks zona bening	Diameter zona bening (cm)	Indeks zona bening
R1	0,7	-	-	-	-	-	-
R2	0,7	2,5	3,6	2,7	3,9	2,9	4,14
R3	0,7	-	-	-	-	-	-
R4	0,5	1,0	2	1,3	2,6	1,5	3
R5	0,7	-	-	-	-	-	-
R6	0,6	-	-	-	-	-	-
G1	0,6	-	-	-	-	-	-
G2	0,7	-	-	-	-	-	-
G3	0,7	1,3	2,2	1,6	2,3	1,8	2,6
G4	0,7	-	-	-	-	-	-
G5	0,5	-	-	-	-	-	-
G6	0,7	0,7	1	1	1,4	1,3	1,9
H1	0,6	-	-	-	-	-	-
H2	0,6	1,5	2,1	1,5	2,5	1,7	2,8
H3	0,7	0,9	1,3	1,1	1,6	1,2	1,7
H4	0,7	1,1	1,6	1,4	2	1,6	2,3
H5	0,7	-	-	-	-	-	-
H6	0,5	-	-	-	-	-	-
H7	0,7	-	-	-	-	-	-
H8	0,6	-	-	-	-	-	-

Lampiran 13. Data Pembuatan standar BSA pada panjang gelombang 685 nm.

Kadar BSA X (g/ml)	Absorban Y	XY	X ²
0	0,0000	0,00	0
100	0,276	27,6	10000
200	0,372	74,4	20000
300	0,392	117,6	30000
400	0,545	218	40000
500	0,796	398	50000
$\Sigma X = 1500$	$\Sigma Y = 2,381$	$\Sigma XY = 835,6$	$\Sigma X^2 = 150000$

Persamaan regresi :

$$Y = A + BX$$

$$B = \frac{n \cdot \Sigma XY - \Sigma X \cdot \Sigma Y}{n \cdot \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}$$

$$= \frac{6 \cdot 835,6 - 1500 \cdot 2,381}{6 \cdot 150000 - (1500)^2}$$

$$= 0,001$$

$$A = \frac{\Sigma Y - B \cdot \Sigma X}{n}$$

$$= \frac{2,381 - 0,001 \cdot 1500}{6}$$

$$= 0,147$$

Jadi persamaan regresi :

$$Y = 0,147 + 0,001 X$$

Lampiran 14. Data Pembuatan kurva kalibrasi standar Maltosa pada panjang gelombang 550 nm.

Kadar asam sitrat X (%)	Absorban Y	XY	X ²
0	0	0	0
100	0,110	11	10000
200	0,185	37	20000
300	0,330	99	90000
400	0,443	177,2	160000
500	0,580	290	250000
600	0,650	390	360000
$\Sigma X = 2100$	$\Sigma Y = 2,298$	$\Sigma XY = 1004,2$	$\Sigma X^2 = 890000$

Persamaan regresi :

$$Y = A + BX$$

$$B = \frac{n \cdot \Sigma XY - \Sigma X \cdot \Sigma Y}{n \cdot \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}$$

$$= \frac{7 \cdot 1004,2 - 2100 \cdot 2,298}{7 \cdot 890000 - (2100)^2}$$

$$= 0,001$$

$$A = \frac{\Sigma Y - B \cdot \Sigma X}{n}$$

$$= \frac{2,298 - 0,001 \cdot 2100}{7}$$

$$= 0,028$$

Jadi persamaan regresi :

$$Y = 0,028 + 0,001 X$$

Lampiran 15. Uji Antimikroba

Nama Isolat	Zona Bening yang terbentuk											
	<i>E. coli</i>			<i>Streptococcus</i>			<i>Stapilococcus</i>			<i>Pseudomonas</i>		
	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
R1	7	8	5	5	8	6	8	9	6	6	9	5
R2	10	14	7	7	10	7	9	14	8	7	14	6
R3	8	9	7	8	9	9	6	8	6	6	8	5
R4	9	10	8	5	6	4	6	7	5	7	9	5
R5	8	9	7	5	7	6	6	8	7	8	7	6
R6	7	8	6	8	8	5	5	7	4	6	8	4,5
G1	9	7	6	8	8	6	7	7,5	6	6	7,5	7
G2	9	9	7	8	14	10	7,5	8	7	7	8,5	7,5
G3	10	10	9	7,5	17	12	8	11	6,5	8	9	9
G4	8	8	7	8	16	8	8,5	9	7	7	8	5
G5	9	9	8	9	11	10	8,5	8,5	6,5	8	9	7
G6	7	7	6	8	9	7	8	8	6	7	8,5	6
H1	10	12	11	9	13	10	4	14	12	6	13	8
H2	8	13	7	10	14	8	3	14	10	5	13	7
H3	7	12	5	7	14	7	5	13	10	7	11	8
H4	5	13	6	6	14	9	7	12	9	8	12	7
H5	3	13	8	7	12	7	6	14	8,5	4	13	6
H6	5	12	9	9	12	8	5	11	7	5	13	4
H7	6	13	8	6	12	7	7	12	8	6	13	8
H8	5	12	7	6	12	7	6	13	7	3	13	6,5

Lampiran 16. Uji Resistensi terhadap Asam

pH dan Antibiotik		E.coli																	
		24 jam						48 jam						72 jam					
		R2	R4	G3	G6	H2	H4	R2	R4	G3	G6	H2	H4	R2	R4	G3	G6	H2	H4
pH 2	14	13	7	8	8	7	14	12	7	8	7	6	17	17	0	0	0	0	0
pH 3	13	8	7	8	8	7	13	9	7	8	7	5	12	16	0	0	0	0	0
pH 4	13	12	7	8	9	8	13	20	7	8	7	6	11	20	0	0	0	0	0
pH 5	12	14	6	8	7	6	15	14	7	8	7	5	19	16	0	0	0	0	0
pH 6	14	15	7	7	7	6	15	9	7	7	7	6	22	22	0	0	0	0	0
Amox	25	12	18	18	8	5	23	17	22	22	19	15	23	10	0	0	0	0	0
Amp	25	17	0	0	24	14	23	11	0	0	0	0	23	15	0	0	0	0	0
Cip	12	5	6	6	17	5	13	10	7	7	8	7	11	8	0	0	0	0	0
Erit	10	9	7	7	0	0	13	8	8	8	6	8	10	7	0	0	0	0	0

pH dan Antibiotik	Streptococcus																							
	24 jam								48 jam								72 jam							
	R2	R4	G3	G6	H2	H4	R2	R4	G3	G6	H2	H4	R2	R4	G3	G6	H2	H4						
pH 2	13	7	0	8	7	6	10	14		8	7	6	12	13	0	0	0	0						
pH 3	14	7	11	8	6	5	13	12	15	8	5	5	13	11	0	0	0	0						
pH 4	12	13	7	7	6	5	12	11	15	7	7	8	11	10	0	0	0	0						
pH 5	13	7	16	6	7	6	10	13	20	6	6	6	12	13	0	0	0	0						
pH 6	12	13	12	11	7	6	11	14	16	11	6	5	12	16	0	0	0	0						
Amox	11	12	22	22	0	0	11	14	22	22	14	10	18	12	0	0	0	0						
Amp	7	9	21	21	25	23	19	14	21	21	13	9	10	13	0	0	0	0						
Cip	22	22	1	1	25	24	23	21	1	1	5	7	20	19	0	0	0	0						
Erit	14	14	23	23	17	15	12	11	23	23	6	5	11	10	0	0	0	0						

pH dan Antibiotik		Staphylococcus:																
		24 jam						48 jam						72 jam				
pH 2	R2	R4	G3	G6	H2	H4	R2	R4	G3	G6	H2	H4	R2	R4	G3	G6	H2	H4
	12	6	7	11	9	8	12	11	7	11	9	8	13	12	0	0	0	0
pH 3	10	7	16	8	10	9	11	9	16	10	6	7	12	10	0	0	0	0
pH 4	9	1	18	10	8	5	8	11	18	10	7	6	7	11	0	0	0	0
pH 5	8	9	17	10	9	6	7	9	17	12	11	10	7	9	0	0	0	0
pH 6	12	1	17	10	7	5	7	8	17	10	10	9	9	8	0	0	0	0
Amox	15	7	6	6	0	0	6	6	6	6	5	6	6	7	0	0	0	0
Amp	9	9	16	16	18	10	6	16	16	16	13	12	6	15	0	0	0	0
Cip	15	10	12	12	12	12	19	18	12	12	11	10	14	12	0	0	0	0
Erit	13	22	11	11	8	7	15	14	11	11	10	9	15	18	0	0	0	0

pH dan Antibiotik		Pseudomonas																							
		24 jam								48 jam								72 jam							
		R2	R4	G3	G6	H2	H4	R2	R4	G3	G6	H2	H4	R2	R4	G3	G6	H2	H4						
pH 2	10	6	51	16	8	7	9	6	51	15	8	8	10	6	0	0	0	0	0						
pH 3	13	8	30	11	8	6	8	7	30	16	5	7	8	8	0	0	0	0	0						
pH 4	10	6	20	14	8	7	13	6	22	14	6	6	14	7	0	0	0	0	0						
pH 5	9	8	22	15	8	6	17	7	27	16	5	7	19	7	0	0	0	0	0						
pH 6	10	10	24	14	7	6	13	7	27	22	4	5	15	6	0	0	0	0	0						
Amox	15	13	11	11	7	5	25	8	11	11	8	7	16	5	0	0	0	0	0						
Amp	24	15	0	0	21	20	17	6	0	0	0	0	23	8	0	0	0	0	0						
Cip	15	11	10	10	0	0	21	13	10	10	9	8	25	12	0	0	0	0	0						
Erit	12	15	6	6	7	6	27	13	6	6	5	4	20	13	0	0	0	0	0						

Lampiran 17. Urutan sekuensing nukleotida

>SAMPEL

CATCTGTCCACCTTAGGCGGCTGGTTCCTAAAAGGTTACCCACCGACTTCGGG
 TGTTACAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATT
 CACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGT
 TGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGA
 GTTCGCAACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGG
 GGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTC
 ACCAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCG
 GGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGT
 ATCCATGTCCCCGAAGGGAACGTCTAATCTCTTAGATTTGCATAGTATGTCAAGA
 CCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTG
 CGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGG
 AATGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTG-
 AAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCATTTCATCGTTTACGGTATGGACTACCAG
 GGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCATACTTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGAC
 CAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTACCCGCTA
 CACATGGAGTTCCACTGTCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCGATGCACT
 TCTTCGGTTGAGCCGAAGGC-TTTCACATCAGAC—
 TTAAAAAACC GCCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCA
 CCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAAT
 ACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAACAACAGAGTT
 TTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTTCGTC
 CATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCGCGTGTCTCAG
 TCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGCCATGGTGAG
 CCGTTACCCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCC
 GAAGCCATCTTTCAAGCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCA
 TCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCACGTGTTACTCACC
 AGTTCGCCACTCACTCAAATGTAAATCATGATGCAAGCACCAATCAATACCAGA
 GTCGTCGACTGCAGATA

